



Marino Filipe Alves dos Santos

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

**Interacções de proteínas do plasma
com potenciais fármacos: estudos 3D a
nível molecular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira

Arguente: Doutora Margarida Archer Baltazar Pereira da Silva Franco Frazão

Vogal: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro de 2011



Marino Filipe Alves dos Santos

Licenciado em Biologia Celular e Molecular

**Interacções de proteínas do plasma
com potenciais fármacos: estudos 3D a
nível molecular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Doutora Teresa Santos-Silva,
Investigadora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira

Arguente: Doutora Margarida Archer Baltazar Pereira da Silva Franco Frazão

Vogal: Doutora Teresa Sacadura Santos-Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro de 2011

“Interacções de proteínas do plasma com potenciais fármacos: estudos 3D a nível molecular”

“Copyright” em nome de Marino Filipe Alves dos Santos, da FCT/UNL e da UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

O passado é a chave do futuro. Certamente em consequência do meu fascínio pela História enquanto ciência, esta é uma das ideias fundamentais pelas quais me oriento. Como tal, parece-me da mais elementar justiça agradecer a todo um leque de personagens que, de modo mais ou menos directo, contribuíram para a realização desta Dissertação.

Em primeiro lugar, aos meus pais (Zé e Ilda), aos meus avós (Daniel e Céu, Eduardo e Álda) e à restante família por todo o apoio e carinho que me deram, dão e darão para seguir este caminho.

À Professora Maria João Romão pela oportunidade de realizar a tese de Mestrado integrado no grupo de Cristalografia (XTAL).

Um agradecimento geral a todos os membros do XTAL: Teresa, Ana Luísa, Zé, Abhik, Angelina, Benedita, Márcia, Cecília, Aldino, Catarina, Diana, Filipe, Carmen e Rita bem como àqueles que saíram no decorrer do último ano (David, Joana e Fábio) e aos alunos de Projecto (Fábio, Cristiana, Susana e Cristiana) pelo facto de terem conseguido lidar com a minha pessoa (o que, reconhecidamente, não é tarefa fácil) e por contribuírem para a boa disposição e espírito de inter-ajuda que impera no grupo.

À Teresa pela excelente orientação, sugestões, preocupação e, sobretudo, pela paciência infinita para com todas as minhas dúvidas existenciais (e ainda mais algumas) desde as mais elaboradas até às, vamos lá, estúpidas.

To Abhik for his totally availability to help me in all my doubts and questions.

À Cecília por ter paciência suficiente para as inúmeras perguntas de “temos isto?” e/ou “onde está aquilo?”.

À Benedita e à Diana por serem as porta-vozes da loucura depois das 18h30 (e antes até) no laboratório 621 e pela ajuda constante ao longo do trabalho.

À Márcia por me ter acompanhado de perto na primeira fase do estágio, por me ter introduzido ao trabalho de bancada no laboratório e pelo cuidado que sempre manifestou com os meus resultados.

À Rita pelas disputas saudáveis pelo uso da *shaker* e, sobretudo, por ter ajudado a desenvolver o projecto que estive na base da presente Dissertação.

Ao Filipe (vénia) por ter sido o meu primeiro “chefe” e ajudado de forma exemplar ao longo da BII (decisiva para a escolha do tema da presente Dissertação), por continuar a ter-me ajudado ao longo deste ano e pelas discussões gratificantes “extra-curriculares” sobre táticas, técnicas, transferências, história e rivalidades (Benfica vs Sporting) de futebol.

A todos os docentes, em especial do DCV e do DQ, que me acompanharam durante 5 anos ao longo da Licenciatura, da BII e do Mestrado na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e contribuíram para o meu crescimento. Uma palavra especial para os professores António Lares, Isabel Sá Nogueira, Nuno Neves, Palmira Fontes da Costa, Anjos Macedo, Jorge Caldeira e Susana Barreiros pela confiança demonstrada em mim.

Aos professores da Escola Secundária Daniel Sampaio por terem contribuído para a minha entrada na faculdade. Um agradecimento especial ao professor Rudolfo por todo o apoio que deu aquando dos Exames Nacionais e pelas dicas e orientação na escolha do curso.

A todos os meus colegas do Secundário por todos os momentos inesquecíveis (excepto para o Mr. Alzheimer do sítio). Em especial, ao Tiago Branco e ao Tiago Pernes que me acompanharam até à FCT e com quem aprendi muito sobre interacções, *corners*, observações científicas ao 29, altos patrocínios e esse grande vulto do pensamento que dá pelo nome de Kant. Todos os trabalhos valeram a pena até porque provaram que um trabalho de grupo pode ser mesmo feito em grupo.

À sala de BCM por simbolizar o espírito da Licenciatura em Biologia Celular e Molecular, ter assumido um papel essencial na minha formação e ter-se tornado num local de peregrinação diária.

Porventura o motivo pelo qual a sala de BCM adquiriu tal estatuto, a todos os meus colegas e amigos que me acompanharam ao longo da licenciatura e do mestrado. Ana Filipa, Cátia, Filipa, João, Nadine, Rui, Sílvia (a minha afilhada preferida), Sofia, Tânia Leandro, Tânia Perestrelo, Vasco Gonçalves, Vasco Gordicho e Viviana: nomes de uma verdadeira equipa sempre munida com um belo baralho de cartas e pronta a ajudar o próximo. Ao João Luz pelos grandes trabalhos e ajuda ao longo do mestrado e pelo seu grande Benfiquismo.

À Tânia Perestrelo (nova vénia), além de todos os trabalhos e estudo árduo para os exames, por me ter introduzido ao porta-minas (esse equipamento essencial para o sucesso académico) e, principalmente, por ser a responsável pela escolha do tema da BII que me trouxe até onde estou hoje. Por toda a ajuda e paciência ao longo de BCM e da BII, só posso dizer que “o” Machico está no meu coração.

Ao Rui (dupla vénia), por tudo e muito mais, um sincero obrigado. Começando pelas missões impossíveis em BCM que conseguimos superar (tantas e tão ricas que se torna impossível numerá-las todas), passando pela descoberta da existência das BII, continuando pela sábia escolha do mestrado e todas as missões ainda mais impossíveis que se colocaram e foram resolvidas com classe e culminando em todos os grandes momentos de humor e boa disposição, é-me impossível não estar grato e perfeitamente consciente que sem a tua ajuda não estaria aqui. O melhor humor não se inventa, advém do dia-a-dia (por Vasco Palmeirim) – a amizade tem um comportamento muito semelhante e, felizmente, a nossa segue-o na perfeição.

E, como parecendo que não, os Agradecimentos já vão longos com todas as menções individuais que descrevi, nada melhor para terminar que realçar a parte inicial: um muito obrigado a todos os que ajudaram neste caminho.

Resumo

Outrora considerado um produto tóxico, reconhecem-se, hoje, ao monóxido de carbono (CO) efeitos biológicos e terapêuticos (nomeadamente anti-inflamatórios); neste sentido, desenvolveram-se metodologias para a sua aplicação destacando-se as Moléculas Libertadoras de Monóxido de Carbono (CORMs). Perspectivando a passagem a fármacos, é indispensável elucidar os mecanismos de acção e de transporte no organismo que dependem, significativamente, das interações estabelecidas com proteínas sanguíneas (hemoglobina, albumina e transferrina).

Assim, no presente trabalho, empregaram-se técnicas de Cristalografia de Raios-X e de Espectroscopia (Ultra-Violeta/Visível e Infra-vermelhos) para caracterizar interações entre as referidas proteínas (juntamente com lisozima) e possíveis CORMs desenvolvidos pela empresa Alfama.

Os estudos com a lisozima indicam a formação de aductos com o ALF 850 confirmando-se, por Cristalografia, a ligação do composto à Histidina 15 com a libertação de 2 moléculas de CO e comprovando-se o respectivo efeito terapêutico. Analogamente, conseguiram-se dados indicativos da formação de aductos entre a hemoglobina e o ALF 850, embora seja necessário prosseguir a investigação no sentido de caracterizá-los estruturalmente.

Optimizou-se ainda a sobre-expressão e a purificação da transferrina em *Pichia pastoris*. Efectuaram-se vários ensaios de *screening* para determinar condições de cristalização da albumina e da transferrina, não se obtendo, contudo, cristais de proteína para o seguimento dos estudos envolvendo os CORMs.

Termos chave: Efeitos biológicos e terapêuticos do monóxido de carbono; Moléculas Libertadoras de Monóxido de Carbono (CORMs); Lisozima; Hemoglobina; Albumina; Transferrina

Abstract

Formerly considered as a toxic substance, carbon monoxide (CO) is nowadays recognized as an agent with biological and therapeutic effects (namely anti-inflammatory); in this sense, several methodologies have been developed for the application of CO with emphasis in Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs). In order to convert CORMs into safe drugs, it is essential to know the mechanisms of action and transport of these molecules in the organism which significantly depends on the interactions established with blood proteins (hemoglobin, albumin and transferrin).

Thus, in this work, X-Ray Crystallography and Spectroscopy (Ultraviolet/Visible and Infrared) techniques were used to characterize the interactions between the mentioned proteins (as well as lysozyme) and possible CORMs developed by the pharmaceutical company Alfama.

Structural studies by X-Ray Crystallography showed the formation of an adduct between ALF 850 and lysozyme Histidine 15 residue with the concomitant release of two CO molecules, confirming the possible therapeutic effect of this compound. Spectroscopic data show the formation of an adduct between ALF 850 and hemoglobin but additional structural information is necessary to confirm this interaction.

Finally, over-expression and purification of transferrin in *Pichia pastoris* were optimized. Several *screening* trials have been tested to establish crystallization conditions for the purified transferrin and commercial albumin. However, protein crystals were not yet obtained to continue the studies with CORMs.

Keywords: Biological and therapeutic effects of carbon monoxide; Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs); Lysozyme; Hemoglobin; Albumin; Transferrin

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
<i>Abstract</i>	V
Índice.....	VII
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XV
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos.....	XVII
 1. – Introdução.....	 1
1.1 – Monóxido de carbono – Papel biológico e aplicações terapêuticas.....	3
1.1.1 – Características, papel tóxico e importância.....	3
1.1.2 – Produção endógena do monóxido de carbono.....	6
1.1.3 – Efeitos biológicos e terapêuticos do monóxido de carbono.....	10
1.1.3.1 – Mecanismos celulares dependentes de monóxido de carbono.....	13
1.1.3.1.1 – Via sGC/cGMP.....	13
1.1.3.1.2 – Via MAPK.....	15
1.1.4 – Administração terapêutica do monóxido de carbono.....	18
1.1.4.1 – Moléculas Libertadoras de Monóxido de Carbono (CORMs).....	20
1.1.4.1.1 – CORMs e metais de transição.....	21
1.1.4.1.2 – Exemplos de CORMs.....	22
1.1.4.1.3 – Interações entre CORMs e proteínas do plasma.....	25
1.2 – Cristalografia de Raios-X.....	26
1.2.1 – Cristais e cristalização de proteínas.....	28
1.2.2 – Resolução da estrutura.....	31
1.2.3 – Refinamento da estrutura.....	34
1.3 – Proteínas em estudo.....	35
1.3.1 – Lisozima.....	35
1.3.2 – Hemoglobina.....	35
1.3.3 – Albumina.....	36
1.3.4 – Transferrina.....	36

2. – Objectivos.....	37
3. - Material e Métodos	41
3.1 – Estudos com Lisozima.....	43
3.1.1 – Reagentes e Equipamento.....	43
3.1.2 – Métodos.....	43
3.2 – Estudos com Hemoglobina.....	44
3.2.1 – Reagentes e Equipamento.....	44
3.2.2 – Métodos.....	45
3.3 – Estudos com Albumina.....	47
3.3.1 – Reagentes e Equipamento.....	47
3.3.2 – Métodos.....	47
3.4 – Estudos com Transferrina.....	48
3.4.1 – Reagentes e Equipamento.....	48
3.4.2 – Métodos.....	49
4. - Resultados e Discussão.....	53
4.1 – Estudos com Lisozima.....	55
4.1.1 – Espectroscopia de Infra-vermelhos.....	55
4.1.2 – Cristalografia de Raios-X.....	57
4.1.2.1 – Ensaio de cristalização.....	57
4.1.2.2 – Experiência de difracção – Lisozima + ALF 850.....	59
4.1.2.3 – Resolução da estrutura – Lisozima + ALF 850.....	61
4.1.2.4 – Refinamento da estrutura – Lisozima + ALF 850.....	63
4.1.2.5 – Caracterização da estrutura – Lisozima + ALF 850.....	66
4.2 – Estudos com Hemoglobina.....	70
4.2.1 – Espectroscopia Ultra-violeta/Visível.....	70
4.2.2 – Espectroscopia de Infra-vermelhos.....	72
4.2.3 – Cristalografia de Raios-X.....	74
4.2.3.1 – Ensaio de cristalização.....	74
4.2.3.2 – Experiência de difracção – Hemoglobina + ALF 850.....	77
4.2.3.3 – Resolução da estrutura – Hemoglobina + ALF 850.....	78
4.2.3.4 – Refinamento da estrutura – Hemoglobina + ALF 850.....	79
4.3 – Estudos com Albumina.....	80
4.3.1 – Ensaio de cristalização.....	80

4.4 – Estudos com Transferrina.....	84
4.4.1 – Sobre-expressão em <i>Pichia pastoris</i> e purificação.....	85
4.4.2 – Ensaio de cristalização.....	90
5. - Conclusão e perspectivas futuras.....	95
6. – Bibliografia.....	101
7. – Anexos.....	109
7.1 – <i>Screen</i> de cristalização JBS1.....	111
7.2 – <i>Screen</i> de cristalização JBS2.....	112
7.3 – <i>Screen</i> de cristalização JBS3.....	113
7.4 – <i>Screen</i> de cristalização JBS4.....	114
7.5 – <i>Screen</i> de cristalização JCSG+.....	115
7.6 – <i>Screen</i> de cristalização PEG/Ion 4K.....	117
7.7 – <i>Screen</i> de cristalização PEG/Ion 8K.....	119
7.8 – <i>Screen</i> de cristalização 80!.....	121
7.9 – Composição do meio MM.....	123
7.10 – Composição do meio BMGY.....	123
7.11 – Composição do meio Basal Salt.....	124
7.12 – Composição do meio PTM-1.....	124

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Esquema da ligação do monóxido de carbono à hemoglobina.....	4
Figura 1.2 – Relação entre a percentagem de carboxihemoglobina e os respectivos efeitos negativos na saúde do Homem.....	5
Figura 1.3 – Cronologia das principais descobertas do papel biológico do monóxido de carbono.....	6
Figura 1.4 – Representação esquemática das fontes de produção endógena de monóxido de carbono.....	6
Figura 1.5 – Esquema dos produtos da degradação do hemo pela oxigenase do hemo.....	7
Figura 1.6 – Representação da localização celular da HO-1 e da HO-2.....	8
Figura 1.7 – Estrutura da oxigenase do hemo-1 de rato (código PDB: 1DVE).....	9
Figura 1.8 – Estrutura da oxigenase do hemo-2 humana (código PDB: 2Q32).....	9
Figura 1.9 – Representação esquemática da interdependência entre o hemo, a oxigenase do hemo e o monóxido de carbono na manutenção da homeostase.....	10
Figura 1.10 – Esquema dos efeitos benéficos e potenciais perigos dos produtos da oxigenase do hemo.....	10
Figura 1.11 – Representação esquemática dos efeitos benéficos do monóxido de carbono (CO).....	11
Figura 1.12 – Representação gráfica dos efeitos de concentrações crescentes de monóxido de carbono.....	12
Figura 1.13 – Esquema da interdependência entre o monóxido de carbono e o óxido nítrico.....	13
Figura 1.14 – Estruturas de guanosina trifosfato e de guanosina monofosfato cíclica.....	14
Figura 1.15 – Mecanismos de acção do monóxido de carbono na via sGC/cGMP.....	14

Figura 1.16 – Efeitos do monóxido de carbono na apoptose das células do endotélio.....	17
Figura 1.17 – Representação esquemática dos efeitos do monóxido de carbono na proliferação celular.....	18
Figura 1.18 – Efeitos do monóxido de carbono na proliferação celular.....	18
Figura 1.19 – Fórmulas estruturais dos CORMs lipossolúveis: CORM-1 e CORM-2.....	22
Figura 1.20 – Formação de COMb pela libertação de CO proveniente do CORM-2.....	23
Figura 1.21 – Fórmulas estruturais dos CORMs hidrossolúveis: CORM-3 e CORM-A1.....	24
Figura 1.22 – Formação de COMb por acção do CORM-3 e do CORM-A1.....	24
Figura 1.23 – Acção vasodilatadora do CORM-3 e do CORM-A1 na aorta de rato.....	24
Figura 1.24 – Espectro electromagnético.....	27
Figura 1.25 – Esquema dos principais passos empregues em Cristalografia de Raios-X desde a cristalização até à obtenção da estrutura final.....	28
Figura 1.26 – Representação esquemática da unidade assimétrica, da célula unitária e da rede cristalina.....	29
Figura 1.27 – Representação esquemática de uma célula unitária e das respectivas constantes da célula.....	29
Figura 1.28 – Representação esquemática dos sete sistemas cristalinos.....	29
Figura 1.29 – Diagrama de fases da cristalização.....	30
Figura 1.30 – Representação esquemática da técnica de gota suspensa.....	31
Figura 1.31 – Representação esquemática da técnica de gota assente.....	31

Figura 1.32 – Representação esquemática de uma experiência de difracção.....	32
Figura 1.33 – Caracterização esquemática das ondas difractadas: comprimento de onda, amplitude e fase.....	32
Figura 4.1 – Cristais de lisozima empregues no <i>soaking</i> com o ALF 850 para análise por Espectroscopia de Infra-vermelhos.....	55
Figura 4.2 – Espectro de infra-vermelhos da amostra de cristais de lisozima com ALF 850.....	56
Figura 4.3 – Cristais de lisozima obtidos nos ensaios de gota suspensa.....	58
Figura 4.4 – Cristais de lisozima obtidos nos ensaios de gota assente.....	58
Figura 4.5 – Cristais de lisozima após o <i>soaking</i> (durante 24 horas) com o ALF 850.....	58
Figura 4.6 – Padrão de difracção do cristal de lisozima com o ALF 850.....	59
Figura 4.7 – Estrutura da lisozima correspondente à entrada 193L do PDB.....	62
Figura 4.8 – Localização dos átomos de ruténio do ALF 850 na estrutura da lisozima.....	66
Figura 4.9 – Caracterização estrutural preliminar do aducto estabelecido entre o Ruténio 1 do ALF 850 e a lisozima.....	68
Figura 4.10 – Efeito da adição do ALF 186 à hemoglobina.....	70
Figura 4.11 – Espectro UV/vis da hemoglobina nativa e da hemoglobina com o ALF 186.....	71
Figura 4.12 – Espectro de infra-vermelhos da amostra de cristais de hemoglobina com ALF 850.....	72
Figura 4.13 – Espectro de infra-vermelhos da amostra de hemoglobina com ALF 850 em solução...	73
Figura 4.14 – Cristais de hemoglobina obtidos nos ensaios de gota suspensa.....	75
Figura 4.15 – Cristais de hemoglobina obtidos pela adição de 5 µl de proteína no poço com 700 µl de solução precipitante.....	75

Figura 4.16 – Padrão de difracção do cristal de hemoglobina com o ALF 850.....	77
Figura 4.17 – Cristal de albumina com ALF 475 obtido nos ensaios de co-cristalização.....	83
Figura 4.18 – Padrão de difracção do cristal de albumina com o ALF 475.....	83
Figura 4.19 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da primeira indução do N-TSH.....	86
Figura 4.20 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da segunda indução do N-TSH.....	86
Figura 4.21 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da purificação do N-TSH por filtração com o <i>Vivacell 250</i>	87
Figura 4.22 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da purificação do N-TSH por precipitação com sulfato de amónio.....	87
Figura 4.23 – Purificação do N-TSH por cromatografia de troca iónica antes da limpeza da coluna Mono Q.....	88
Figura 4.24 – Purificação do N-TSH por cromatografia de troca iónica após a limpeza da coluna Mono Q.....	89
Figura 4.25 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados do N-TSH não sujeito a troca iónica.....	90
Figura 4.26 – Cristais de transferrina obtidos nos ensaios de gota suspensa.....	91
Figura 4.27 – Cristais de transferrina obtidos nos ensaios de <i>screening</i>	92

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Propriedades do monóxido de carbono.....	3
Tabela 1.2 – Principais características das oxigenases do hemo (HO) 1, 2 e 3.....	7
Tabela 1.3 – Lista de indutores e estímulos da actividade da oxigenase do hemo-1.....	8
Tabela 1.4 – Correlação entre a concentração de monóxido de carbono e o seu efeito.....	12
Tabela 3.1 – Condições de cristalização testadas para a hemoglobina através da técnica de gota suspensa.....	46
Tabela 3.2 – Factores de multiplicação usados na precipitação com sulfato de amónio.....	50
Tabela 4.1 – Resumo das condições e resultados de difracção dos cristais de lisozima analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF e Soleil).....	59
Tabela 4.2 – Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews do cristal de lisozima com o ALF 850.....	60
Tabela 4.3 – Estatísticas do refinamento inicial e final da estrutura de lisozima com o ALF 850.....	64
Tabela 4.4 – Factores de ocupação e factores B dos átomos de ruténio do ALF 850 presentes na estrutura da lisozima.....	67
Tabela 4.5 – Distâncias inter-atómicas entre o Ruténio 1 do ALF 850 e os respectivos ligandos.....	68
Tabela 4.6 – Condições, tipo de gota e temperatura de cristalização empregues na obtenção de cristais de hemoglobina.....	74
Tabela 4.7 – Resumo das condições e resultados de difracção dos cristais de hemoglobina analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF e Soleil).....	76

Tabela 4.8 – Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews do cristal de hemoglobina com o ALF 850.....	78
Tabela 4.9 – Estatísticas do refinamento inicial da estrutura de hemoglobina com o ALF 850.....	79
Tabela 4.10 – Condições e temperatura de cristalização empregues na obtenção de cristais de albumina (100 e 150 mg/ml).....	81
Tabela 4.11 – Condições de cristalização empregues na obtenção de cristais de albumina (100 e 150 mg/ml) após <i>seeding</i>	82
Tabela 4.12 – Resumo das condições e resultados de difracção do cristal de albumina analisado por radiação de Sincrotrão (ESRF).....	83
Tabela 4.13 – Condições, tipo de gota e temperatura de cristalização do <i>screen</i> 80! onde se observou a formação de cristais de transferrina.....	90
Tabela 4.14 – Condições, tipo de gota e temperatura de cristalização dos <i>screens</i> PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K e JBS3 onde se observou a formação de cristais de transferrina.....	92
Tabela 4.15 – Resumo das condições e resultados de difracção dos cristais de transferrina analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF).....	93

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

α – Fase da onda

ε – Coeficiente de extinção molar

λ – Comprimento de onda

$\rho(x,y,z)$ – Densidade electrónica

$|F_{hkl}|$ – Amplitude do Factor de Estrutura

$|F_{obs}|$ ou $|F_o|$ – Amplitude do Factor de Estrutura observada

$|F_{calc}|$ ou $|F_c|$ – Amplitude do Factor de Estrutura calculada

Abs – Absorvância

Ach – Acetilcolina

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

BVR – Biliverdina Redutase (do inglês *Biliverdin Reductase*)

Ca^{2+} – Cálcio

Ca_v – Canais de Cálcio

CCP4 – *Collaborative Computational Project Number 4*

cGMP – Guanosina Monofosfato cíclica (do inglês *cyclic Guanosine Monophosphate*)

CO – Monóxido de Carbono

COHb – Carboxihemoglobina

COMb – Carboximioglobina

Coot – *Crystallographic Object-Oriented Toolkit*

CORMs – Moléculas Libertadoras de Monóxido de Carbono (do inglês *Carbon Monoxide Releasing Molecules*)

CORM-1 – Carbonilo de manganês

CORM-2 – Dicloro tricarbonilo de ruténio (II)

CORM-3 – Cloro tricarbonilo (glicinato) de ruténio (II)

CORM-A1 – Boranocarbonato de sódio

Crio-EM – Microscopia Electrónica a Temperatura Criogénica

CSD – *Cambridge Structural Database*

DCM – Diclorometano

DM – *Density Modification*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ERK – Proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular (do inglês *Extracellular Signal-regulated Protein Kinase*)

ESRF – *European Synchrotron Radiation Facility*

F – Amplitude da onda

F_{hkl} – Factor de Estrutura

F_{calc} ou F_c – Factor de Estrutura calculado

F_{obs} ou F_o – Factor de Estrutura observado

Fe^{2+} – Ferro ferroso

Fe^{3+} – Ferro férrico

GTP – Guanosina Trifosfato (do inglês *Guanosine Triphosphate*)

H₂S – Sulfureto de Hidrogénio

Hb – Hemoglobina

HEPES – (4- (2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfónico)

HO – Oxigenase do Hemo (do inglês *Heme Oxygenase*)

HO-1 – Oxigenase do Hemo-1 (do inglês *Heme Oxygenase-1*)

HO-2 – Oxigenase do Hemo-2 (do inglês *Heme Oxygenase-2*)

HO-3 – Oxigenase do Hemo-3 (do inglês *Heme Oxygenase-3*)

HSF1 – Factor de Choque Térmico 1 (do inglês *Heat Shock Factor 1*)

HSP70 – Proteína de Choque Térmico 70 (do inglês *Heat Shock Protein 70*)

ICP – Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês *Induction Coupled Plasma*)

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-10 – Interleucina-10

I/R - Isquémia/reperfusão

JNK – Proteína Cinase NH₂-terminal c-Jun (do inglês *c-Jun NH₂-terminal Protein Kinase*)

KBr – Brometo de potássio

K_{Ca} – Canais de Potássio Activados por Cálcio

kDa – kiloDalton

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês *Low Density Lipoprotein*)

LLG – *Log Likelihood Gain*

MAD – Dispersão Anómala Múltipla (do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*)

MAPK – Proteína Cinase Activada por mitogénios (do inglês *Mitogen-activated Protein Kinase*)

MCCs – Complexos Metal Carbonilo (do inglês *Metal Carbonyl Complexes*)

MES – Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

MIP-1 α – Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 α (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein 1 α*)

MIR – Substituição Isomórfica Múltipla (do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*)

MPD – 2-metil-2,4 pentadiol

MR – Substituição Molecular (do inglês *Molecular Replacement*)

N-TSH – Lóbulo N-terminal da Transferrina do Soro Humano

NaCl – Cloreto de sódio

NANC – Neurotransmissor não-adrenérgico e não-colinérgico

NH₄Cl – Cloreto de amónio

NH₄I – Iodeto de amónio

NO – Óxido Nítrico

NOS – Sintase do Óxido Nítrico (do inglês *Nitric Oxide Synthase*)

O₂ – Oxigénio

O₂Hb – Oxihemoglobina

p38 – p38 MAPK

PDB – *Protein Data Bank*

PDE – Fosfodiesterase (do inglês *Phosphodiesterase*)

PDGF – Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês *Platelet-derived Growth Factor*)

PEG – Polietilenoglicol

pI – Ponto isoeléctrico

PKG – Proteína Cinase G (do inglês *Protein Kinase G*)

PoliypK15 – Polivinilpirrolidona K15

ppm – Partes por milhão

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso (do inglês *Rough Endoplasmic Reticulum*)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – Raiz Quadrada da Variância ou Desvio Padrão (do inglês *Root Mean Square Deviation*)

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

sGC – Guanilato Ciclase solúvel (do inglês *soluble Guanylate Cyclase*)

SDS-PAGE - Electroforese em Gel de Poliacrilamida e Dodecil-Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SER – Retículo Endoplasmático Liso (do inglês *Smooth Endoplasmic Reticulum*)

TGF – Factor de Crescimento Transformante (do inglês *Transforming Growth Factor*)

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

TNF α – Factor de Necrose Tumoral α (do inglês *Tumor Necrosis Factor α*)

VEGF – Factor de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)

V_M – Coeficiente de Matthews

UV/vis – Espectroscopia Ultra-violeta/Visível

1. – Introdução

1.1 – Monóxido de carbono – Papel biológico e aplicações terapêuticas

1.1.1 – Características, papel tóxico e importância

O monóxido de carbono (de fórmula química CO), gás incolor e inodoro, é reconhecido pela maioria da população por ser um poluente atmosférico e uma substância tóxica (vulgarmente designado por “assassino silencioso”) para o Homem ^{1,2}.

Na Tabela 1.1, encontram-se listadas algumas das principais propriedades do monóxido de carbono. Como se pode observar, o CO possui um ponto de ebulição bastante baixo o que faz com que, nas condições de temperatura e pressão atmosféricas, se apresente na forma de gás. Destaca-se ainda a sua estabilidade química para a qual contribui a existência de uma ligação tripla entre o carbono e o oxigénio ³.

Tabela 1.1 – Propriedades do monóxido de carbono – Adaptado de ^{1,2,3}

Massa molecular	28.01 g/mol
Ponto de fusão	– 205 °C
Ponto de ebulição	– 191.5 °C
Temperatura de auto ignição	606 °C
Solubilidade (em água)	3.3 ml por 100 ml de água (a 0 °C)
	2.3 ml por 100 ml de água (a 20 °C)
Densidade	1.250 g/L
Reactividade	Inerte excepto com proteínas hémicas
Metabolismo	Nenhum

O monóxido de carbono provém da combustão incompleta de compostos ricos em carbono (que abrangem diversas matérias e nas quais se destacam os combustíveis fósseis). Assim sendo, embora seja produzido na Natureza, as actividades humanas iniciadas aquando da Revolução Industrial e que perduram até aos nossos dias contribuem de forma decisiva para os níveis de CO verificados na atmosfera ^{3,4,5}.

Descoberto nos finais do século XVIII, o monóxido de carbono foi visto unicamente como uma substância tóxica e sem interesse biológico durante largos anos quer pela comunidade científica quer pela opinião pública. Para esta visão negativa do CO, particularmente a demonstrada pela sociedade e que subsiste até à actualidade, não se pode ignorar a influência de obras literárias e cinematográficas e, principalmente, o papel da comunicação social que, variadas vezes, transmite

pareceres de qualidade do ar elaborados por agências ambientais e nos quais o CO é um dos poluentes mais visados ou dissemina casos de envenenamento por CO ^{1,5,6}.

De facto, a acção do monóxido de carbono como tóxico é inegável sobretudo devido às interações estabelecidas com a hemoglobina e desde há muito conhecidas. Na década de 50 do século XIX, Claude Bernard identificou que a referida ligação pode levar à asfixia sendo necessário avançar cerca de 55 anos, até 1912, para John Haldane e colaboradores conseguirem elucidar o processo de ligação ^{5,6}.

O monóxido de carbono liga-se fortemente à hemoglobina formando carboxihemoglobina (de sigla COHb) e diminuindo a capacidade de oxigenação do sangue (Figura 1.1). O oxigénio e o monóxido de carbono competem pela ligação ao átomo de ferro na forma ferrosa (Fe^{2+}) dos grupos hemo da hemoglobina; como a proteína possui uma afinidade para o CO entre 210 a 250 vezes maior que para o oxigénio, assiste-se à ligação preferencial do CO o que explica a referida diminuição da oxigenação ^{1,4}.

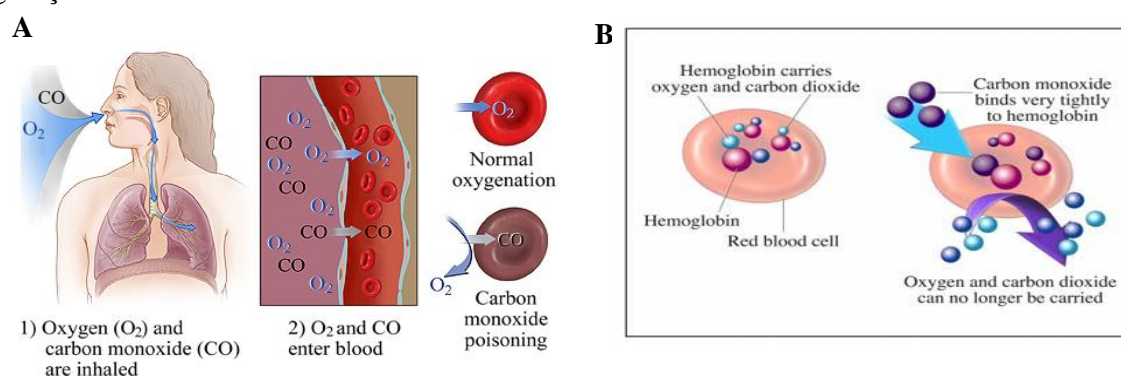


Figura 1.1 – Esquema da ligação do monóxido de carbono à hemoglobina

Adaptado de <http://www.empowher.com/media/reference/carbon-monoxide-poisoning> e <http://www.health.com/health/library/mdp/0,,zm2552,00.html>

A – Quando inalado, o monóxido de carbono liga-se fortemente à hemoglobina formando carboxihemoglobina

B – A carboxihemoglobina provoca uma menor oxigenação do sangue visto que a ligação do monóxido de carbono impede o normal transporte de oxigénio até aos tecidos

Naturalmente, o decréscimo da oxigenação potencia situações de hipóxia nos tecidos (com ênfase nos que requerem grandes quantidades de oxigénio para o seu normal funcionamento como o cérebro e o coração). As situações de hipóxia levam a sintomas diversos que incluem tonturas ou náuseas, dificuldades respiratórias e desmaio; em casos extremos nos quais não existe um tratamento eficaz, a exposição a CO pode mesmo levar à morte.

Como facilmente se percebe, face à sua existência natural, o organismo humano apresenta um certo nível de tolerância ao CO. Estudos indicam que níveis de COHb situados entre 15% e 20% são compatíveis com o transporte normal de oxigénio até aos vários tecidos; a partir destes valores começam a surgir os sintomas supracitados enquanto que níveis superiores a 80% são fatais (Figura 1.2) ^{1,2,4}.

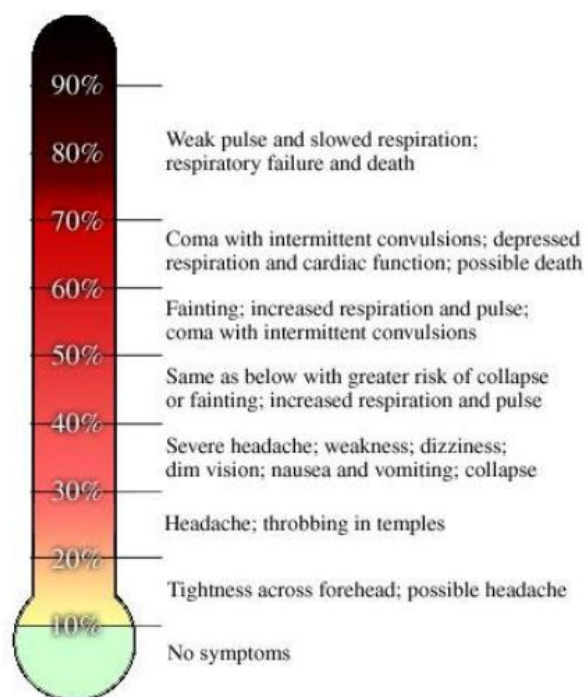
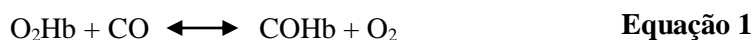


Figura 1.2 – Relação entre a percentagem de carboxihemoglobina e os respectivos efeitos negativos na saúde do Homem

in <http://www.emedicinehealth.com/script/main/art.asp?articlekey=138526&ref=128857>

Tendo em conta que a ligação do CO à hemoglobina é reversível (Equação 1), o tratamento das intoxicações por CO pode ser conseguido pela aplicação de grandes quantidades de oxigénio (por exemplo, através de terapia hiperbárica de oxigénio) de modo a substituir o CO e a conseguir deslocar-se o equilíbrio da reacção representada na Equação 1 para a esquerda, ou seja, no sentido da formação dos reagentes ^{1,7}.



Deste modo, tomando em consideração os aspectos apresentados, compreendem-se as razões pelas quais o monóxido de carbono era visto como algo totalmente a evitar.

Contudo, esta realidade mudou substancialmente no início da segunda metade do século XX com a descoberta da produção endógena de monóxido de carbono. Foi então que se alargou o estudo do CO a novos domínios e foi possível compreender a sua intervenção em muitos outros fenómenos (Figura 1.3). Por exemplo, acredita-se que o monóxido de carbono desempenhou um papel muito importante no surgimento da vida na Terra na medida em que a existência de uma atmosfera redutora favoreceu a síntese de várias biomoléculas nomeadamente os aminoácidos ⁸.

Nas próximas secções, pretende-se aprofundar os fenómenos que envolvem o monóxido de carbono designadamente a sua produção endógena e possíveis aplicações terapêuticas.

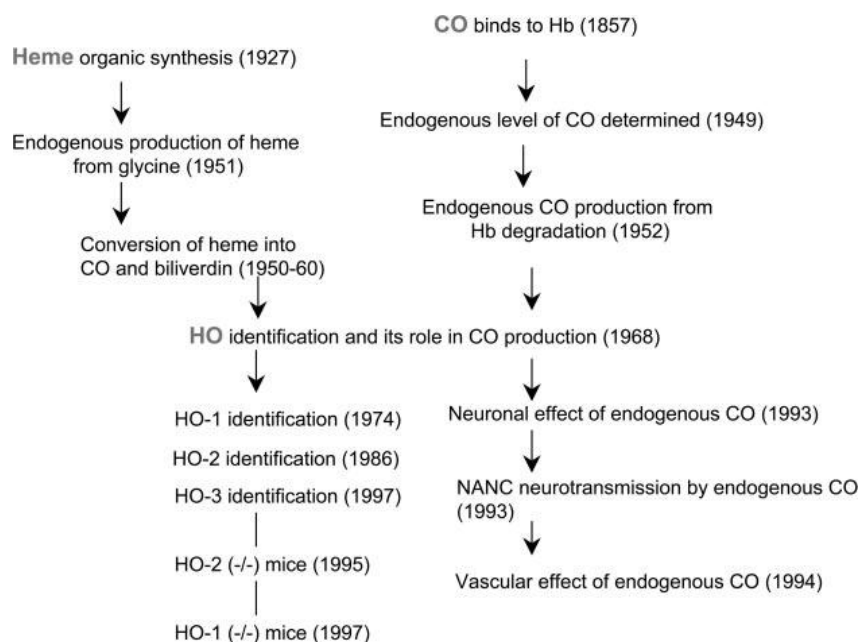


Figura 1.3 – Cronologia das principais descobertas do papel biológico do monóxido de carbono ⁵
 CO – Monóxido de carbono; Hb – Hemoglobina; HO/HO-1/HO-2/HO-3 – Hemo oxigenase/1/2/3; NANC – Neurotransmissor não-adrenérgico e não-colinérgico

1.1.2 – Produção endógena do monóxido de carbono

Como referido, a juntar à sua formação exógena, o monóxido de carbono é produzido de forma endógena pela quase totalidade dos seres vivos nomeadamente pelos mamíferos nos quais se inclui o Homem. A maioria do CO gerado de modo endógeno provém da acção de enzimas designadas por oxigenases do hemo (de sigla HO do inglês *heme oxygenase*) embora exista uma percentagem menos significativa proveniente de diferentes reacções que incluem a foto-oxidação de compostos orgânicos e a peroxidação dos lípidos (Figura 1.4) ^{5,9,10}.

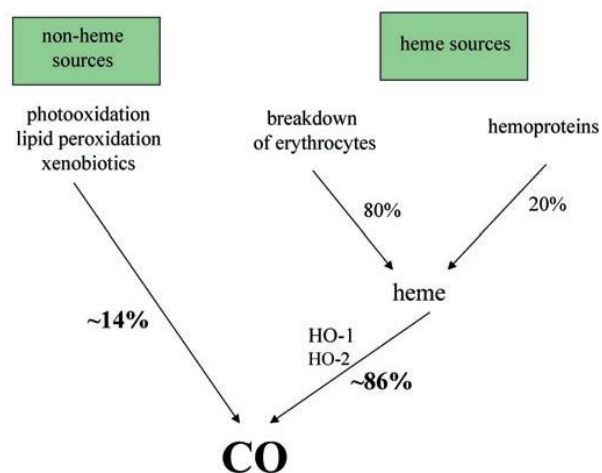


Figura 1.4 – Representação esquemática das fontes de produção endógena de monóxido de carbono ⁹
 HO-1/HO-2 – Oxigenase do hemo-1/2; CO – Monóxido de carbono

Diversos estudos foram realizados no sentido da descoberta da produção endógena de CO. Merecem destaque as experiências de Sjöstrand, em 1952, que permitiram verificar a formação de CO aquando da degradação da hemoglobina *in vivo* e as de Tenhunen e colaboradores que, dezasseis anos

volvidos, em 1968, identificaram a HO como a enzima responsável pela degradação do hemo proveniente da reciclagem das proteínas hémicas e cuja acção leva à formação de CO ⁵.

Assim, a acção da HO requer a presença de NADPH e de oxigénio como cofactores e, a partir do hemo, possibilita a síntese (em quantidades equivalentes) de CO, de ferro ferroso (Fe^{2+}) e de biliverdina posteriormente convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase (Figura 1.5). Como se irá analisar, todos estes metabolitos desempenham um papel importante na manutenção da homeostase ^{9,10,11}.

A



B

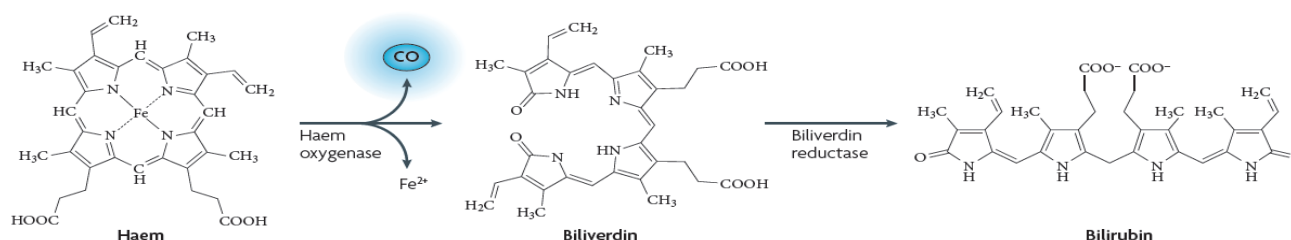


Figura 1.5 – Esquema dos produtos da degradação do hemo pela oxigenase do hemo – Adaptado de ^{1,11}
A – Molécula de hemo com a região do carbono α meteno (cuja oxidação leva à degradação do hemo) assinalada a amarelo

B – A degradação do hemo leva à formação de monóxido de carbono (CO), ferro ferroso (Fe^{2+}) e biliverdina que é convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase

Nos anos subsequentes, foram descobertas três isoformas da oxigenase do hemo: oxigenase do hemo-1 (HO-1), oxigenase do hemo-2 (HO-2) e oxigenase do hemo-3 (HO-3) cujas principais características e diferenças se encontram na Tabela 1.2 ^{9,12}.

Tabela 1.2 – Principais características das oxigenases do hemo (HO) 1, 2 e 3 – Adaptado de ¹²

	HO-1	HO-2	HO-3
Expressão	Indutível	Constitutiva	Desconhecida
Homologia	43% com HO-2	43% com HO-1	50% com HO-1
	50% com HO-3	90% com HO-3	90% com HO-2
Papel biológico	Protecção celular	Mecanismos de regulação envolvendo hemo	Reconhecimento do hemo

A oxigenase do hemo-1, igualmente designada por HSP32, identificada na década de 70 do século XX, possui 32 kDa e encontra-se localizada no retículo endoplasmático embora alguns dados sugiram que pode ainda ser encontrada noutros compartimentos celulares como o núcleo e as mitocôndrias (Figura 1.6) ^{3,5}.

Caracteriza-se pelo facto de ser indutível, isto é, ser activada por uma grande variedade de estímulos físicos e químicos (Tabela 1.3) originados por situações desfavoráveis ou de perigo para a célula. Deste modo, a presença de dado estímulo aumenta igualmente a actividade da HO-1 existindo diversas investigações indicativas que este aumento permite às células resistirem de forma mais eficaz às adversidades com que se deparam e, portanto, estar incluído em mecanismos protectores^{3,5,9,13,14,15}.

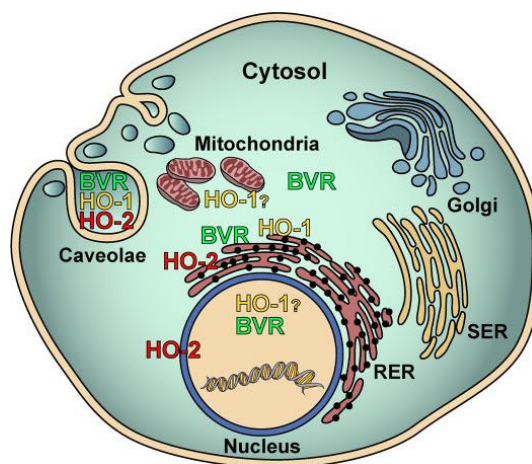


Figura 1.6 – Representação da localização celular da HO-1 e da HO-2³

BVR – Biliverdina redutase; HO-1/2 – Oxigenase do hemo-1/2; RER – Retículo endoplasmático rugoso; SER – Retículo endoplasmático liso

Tabela 1.3 – Lista de indutores e estímulos da actividade da oxigenase do hemo-1 – Adaptado de^{3,13}
IL – Interleucina; TGF – Factor de crescimento transformante; PDGF – Factor de crescimento derivado de plaquetas; VEGF – Factor de crescimento endotelial vascular; LDL – Lipoproteína de baixa densidade

Categoria do estímulo	Exemplos
Geração de stress oxidativo	Peróxido de hidrogénio, Peroxinitrilo, Radiação ultra-violeta
Reactivos com o grupo tiol	Arsenito de sódio, Cloreto de cádmio, Iodoacetamina
Metais pesados	Cádmio, Estanho, Chumbo
Metaloporfirinas	Hemo
Óxido nítrico e derivados	Óxido nítrico, α -oxihiponitrato de sódio (sal de Angeli), Peroxinitrito
Citocinas	IL-1 α/β , IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, IL-18
Factores de crescimento	TGF α/β , PDGF, VEGF
Outros	Hipóxia, Hiperóxia, Endotoxinas, LDL oxidada

Consequentemente, em casos de stress, assiste-se a uma alta expressão da HO-1 na generalidade dos tecidos de modo a conseguir-se uma protecção celular eficaz. Pelo contrário, em situações normais, a sua expressão é praticamente reduzida ao baço e a células especializadas do fígado e da medula óssea onde se dá a degradação da hemoglobina^{3,5,9,13,14,15}.

A estrutura da HO-1 foi já resolvida por Cristalografia de Raios-X (Figura 1.7) sendo possível observar a existência de várias hélices α orientadas de modo a que a hélice distal (representada por F na Figura 1.7) se posicione junto à região alvo da degradação do hemo^{16,17}.

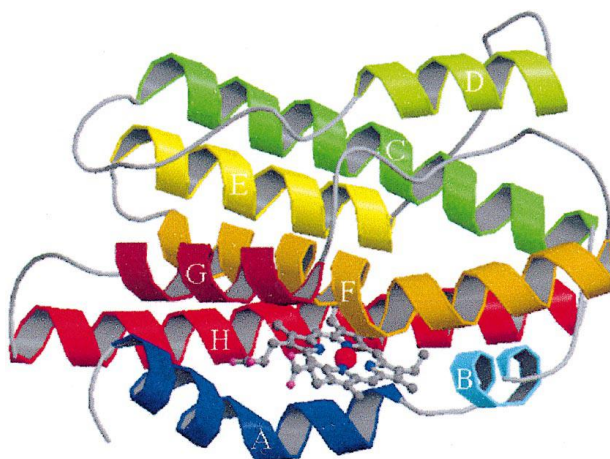


Figura 1.7 – Estrutura da oxigenase do hemo-1 de rato (código PDB: 1DVE)¹⁶

A ordenação das hélices (A a H) corresponde ao avanço do N-terminal até ao C-terminal

A (Azul escuro): Leu13-Glu29; **B** (Azul claro): Glu32-Gln38; **C** (Verde escuro): Arg44-Asn68; **D** (Verde claro): Arg86-Tyr97; **E** (Amarelo): Pro109-Thr124; **F** (Laranja): Leu129-Met155; **G** (Castanho): Pro175-Met186; **H** (Vermelho): Pro193-Thr222

A oxigenase do hemo-2, identificada nos anos 80, possui 36 kDa e, tal como a HO-1, encontra-se localizada no retículo endoplasmático embora pesquisas efectuadas tenham demonstrado a sua presença no núcleo (Figura 1.6)^{3,5}.

A sua principal característica (que a diferencia da HO-1) consiste no facto de ser constitutiva, ou seja, a sua expressão ocorre de modo contínuo independentemente da presença ou da ausência de estímulos. Por outro lado, contrariamente à HO-1, a HO-2, além do domínio catalítico, exhibe domínios regulatórios capazes de promover a ligação ao hemo, mas sem levar à sua degradação. Esta observação levanta a hipótese da HO-2 participar em mecanismos regulatórios que envolvam o hemo em vários sistemas biológicos designadamente no cérebro onde a sua expressão é mais significativa (embora não se devam ignorar outros órgãos como o fígado e os rins onde se registam igualmente níveis elevados de HO-2)^{3,5,9,13,14,15}.

A estrutura tridimensional da HO-2 foi também elucidada por Cristalografia de Raios-X (Figura 1.8) verificando-se uma estrutura semelhante à HO-1 com a existência de várias hélices α e com a hélice distal (representada por A5 na Figura 1.8) junto à região alvo da degradação do hemo¹⁸.

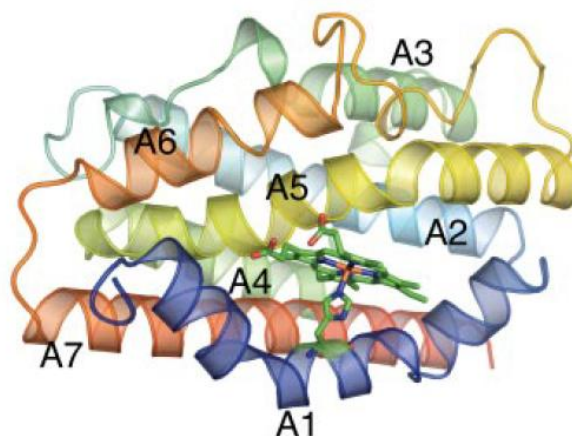


Figura 1.8 – Estrutura da oxigenase do hemo-2 humana (código PDB: 2Q32)¹⁸

A coloração das hélices (A1 a A7) corresponde ao avanço do N-terminal (azul) até ao C-terminal (vermelho)

A oxigenase do hemo-3 foi a última a ser identificada (nos finais dos anos 90), mas a sua identificação restringiu-se a determinados órgãos em ratos (tal como a HO-2, salientam-se o cérebro, o fígado e os rins). O principal elemento diferenciador face às anteriores isoformas reside na sua baixa capacidade de metabolizar o hemo o que levanta dúvidas em relação ao seu papel biológico. Contudo, atendendo à elevada homologia com a HO-2, é possível que desempenhe também funções de reconhecimento e de ligação do hemo. Por outro lado, a homologia com a sequência proteica da HO-2, aliada ao facto do gene da HO-3 possuir unicamente exões, permite acreditar que o surgimento da HO-3 seja o resultado do fenómeno de retrotransposição do gene da HO-2 o que parece corroborar as funções que lhe são atribuídas ^{5,9}.

Em conclusão, a HO desempenha um papel fundamental no metabolismo do hemo e consequentemente na manutenção da homeostase. Se ao início se acreditava que a acção da HO se limitava à simples regulação dos níveis de hemo presentes no organismo, gradualmente foi-se percebendo a existência de um controlo apertado entre o hemo, a HO e os produtos provenientes da sua acção que, muito mais que garantir os níveis de hemo adequados, se revela absolutamente necessário para o correcto funcionamento celular em grande parte devido aos efeitos exercidos pelo CO produzido (Figura 1.9) ⁵.

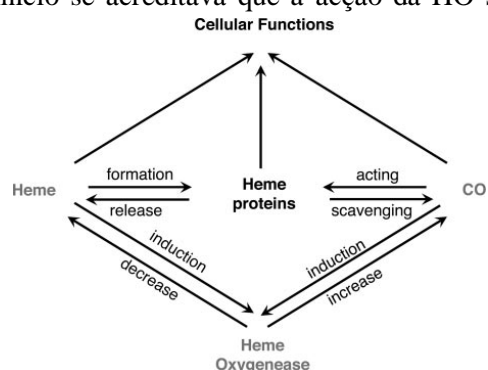


Figura 1.9 – Representação esquemática da interdependência entre o hemo, a oxigenase do hemo e o monóxido de carbono na manutenção da homeostase ⁵

1.1.3 – Efeitos biológicos e terapêuticos do monóxido de carbono

Conforme descrito, a oxigenase do hemo é fundamental no metabolismo do hemo. Durante muito tempo, os produtos originados na degradação do hemo (bilirrubina, ferro e monóxido de carbono) foram vistos apenas como resíduos potencialmente nefastos para a viabilidade celular. Contudo, actualmente, não existem dúvidas que, a juntar aos possíveis efeitos negativos, estes metabolitos desempenham igualmente um papel importante no normal funcionamento celular ao contribuírem para a sua protecção (Figura 1.10) ^{9,19}.

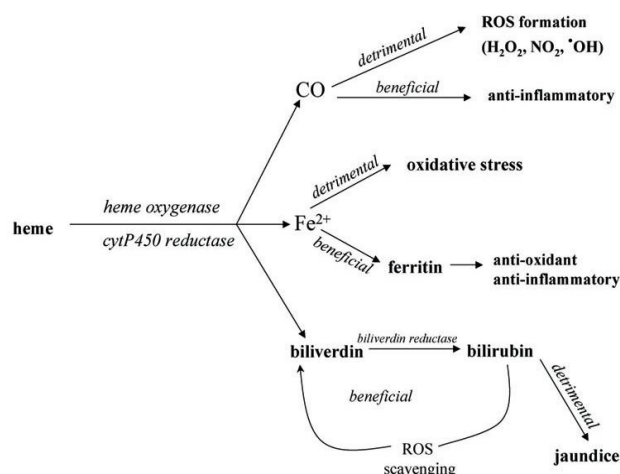


Figura 1.10 – Esquema dos efeitos benéficos e potenciais perigos dos produtos da hemo oxigenase ⁹

Nos próximos parágrafos, pretende-se sumariar os principais efeitos resultantes da acção dos produtos da hemo oxigenase.

Começando pela biliverdina e pela bilirrubina, o seu efeito protector relaciona-se com a capacidade destas moléculas em diminuir significativamente os casos de stress oxidativo ao conseguirem diminuir a quantidade de Espécies Reactivas de Oxigénio (de sigla ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) presentes no interior da célula ^{4,13,20}.

Já no caso do Fe^{2+} , não se pode negar o seu potencial de geração de ROS (pode ceder electrões) o que, aparentemente, lhe retira qualquer hipótese de participar em acções benéficas. Contudo, a célula consegue ultrapassar este hipotético problema ao estimular a produção de ferritina como resposta ao aumento da concentração de Fe^{2+} ; tem-se pois que a presença da ferritina (proteína responsável pelo armazenamento do ferro controlando a sua disponibilidade e funcionando como um agente anti-oxidante) acrescenta um passo de controlo adicional dos níveis de ROS existentes na célula ^{4,13,20}.

Por último, o monóxido de carbono, cuja actuação se pretende abordar de forma mais minuciosa na presente Dissertação, faz sentir a sua acção ao conferir propriedades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e anti-apoptóticas à célula sendo responsável por muitos dos efeitos benéficos comprovados da oxigenase do hemo (Figura 1.11) ^{1,4,20}.

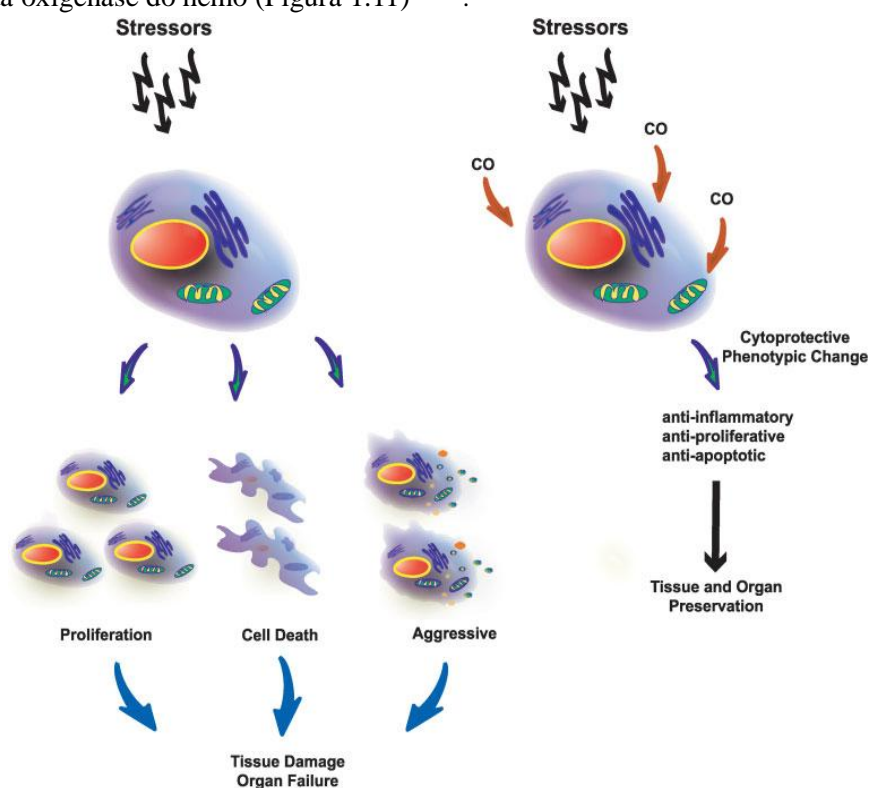


Figura 1.11 – Representação esquemática dos efeitos benéficos do monóxido de carbono (CO) ¹
 Face a agentes adversos que levam a danos nos tecidos e órgãos, a presença de CO consegue contrariar esses mesmos efeitos conferindo propriedades de protecção celular que asseguram o seu normal funcionamento

Recordando os efeitos tóxicos do CO abordados previamente, o seu envolvimento em mecanismos de protecção pode causar surpresa. Todavia, e exemplificando a estreita relação entre avanços científicos e o reconhecimento das investigações passadas (sistemizada no ramo relativamente recente da História da Ciência), a surpresa diminui se se pensar no conceito já defendido por Paracelsus no século XVI segundo o qual “só a dose, faz o veneno” (Figura 1.12 e Tabela 1.4). Admitindo esta realidade, as acções benéficas do CO começam a tornar-se mais credíveis ^{2,21}.

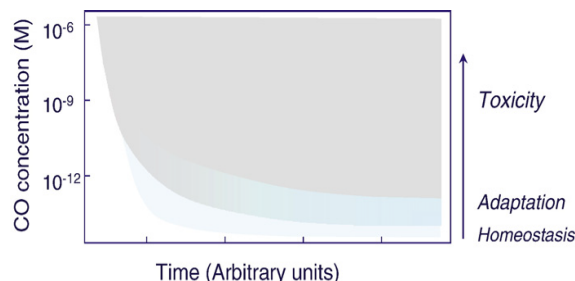


Figura 1.12 – Representação gráfica dos efeitos de concentração crescente de monóxido de carbono ²¹

De acordo com a concentração e o tempo de exposição, o monóxido de carbono (CO) pode desempenhar um papel benéfico ou tóxico

Tabela 1.4 – Correlação entre a concentração de monóxido de carbono e o seu efeito ²

Concentração	Efeito
10000 ppm (1%)	Letal em minutos
10-500 ppm (0.001 a 0.05%)	Eficácia pré-clínica
10 ppm (0.001%)	Nenhum (ar atmosférico)

De modo complementar, um outro factor importante no estabelecimento dos efeitos protectores do CO prende-se com a existência de estudos prévios sobre os efeitos biológicos de diferentes gases (óxido nítrico e sulfureto de hidrogénio) que lançou a possibilidade do CO seguir um comportamento semelhante. A título exemplificativo, os estudos realizados com o óxido nítrico (NO) mostraram capacidade de vasodilatação pelo que é comumente usado no tratamento da hipertensão pulmonar infantil enquanto que as pesquisas sobre o sulfureto de hidrogénio (H₂S) permitiram concluir acerca de propriedades de sinalização nos sistemas nervoso e circulatório ^{22,23}.

Com o desenrolar das várias investigações, é hoje possível agrupar estes três gases (CO, NO e H₂S) numa mesma família de mediadores biológicos partilhando diversas características semelhantes embora se possa notar, desde logo, que o CO é mais estável quando comparado com o NO e o H₂S o que se revela uma vantagem na compreensão dos mecanismos onde se encontra envolvido ^{11,23}.

Mais do que o agrupamento do CO e do NO na mesma família, a prossecução das investigações desvendou a existência de uma relação íntima entre a produção endógena dos dois gases pela hemo oxigenase e pela sintase do óxido nítrico (de sigla NOS), respectivamente. De facto, constata-se que o CO pode modular a actividade da NOS de acordo com o ambiente celular favorecendo ou reprimindo a formação de NO; o contrário é igualmente verdade com o NO a conseguir influenciar a produção de CO pela HO conforme as condições da célula (Figura 1.13) ^{2,11}.

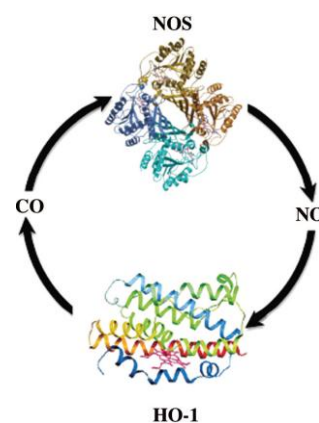


Figura 1.13 – Representação esquemática da interdependência entre o monóxido de carbono e o óxido nítrico ²
O CO e o NO produzidos de modo endógeno modulam, respectivamente, a actividade da sintase do óxido nítrico e da hemo oxigenase de acordo com as condições da célula
CO – Monóxido de carbono; HO-1 – Oxigenase do hemo-1; NO – Óxido nítrico; NOS – Sintase do óxido nítrico

1.1.3.1 – Mecanismos celulares dependentes de monóxido de carbono

No sentido de assegurar a melhor compreensão dos fenómenos desencadeados pelo CO, várias equipas de investigação em diferentes pontos do globo focam a sua acção no presente objecto de estudo. A verdade é que, embora com avanços consideráveis que fornecem indicações valiosas sobre o modo de actuação do CO, o fenómeno encontra-se longe de estar totalmente esclarecido e elucidado.

Deste modo, irão ser abordados dois dos mecanismos celulares melhor caracterizados que, e longe de constituir uma revisão pormenorizada, exemplificam as acções dependentes do CO: via sGC/cGMP e via MAPK.

1.1.3.1.1 – Via sGC/cGMP

A via sGC/cGMP constitui um dos mecanismos mais explorados na qual se assiste à ligação do CO à enzima guanilato ciclase solúvel (de sigla sGC) que fomenta a conversão de guanosina trifosfato, de sigla GTP, em guanosina monofosfato cíclica, de sigla cGMP (Figura 1.14).

A via sGC/cGMP foi primeiramente identificada com o NO a ligar-se à sGC, mas pensa-se que o CO siga um mecanismo idêntico o que parece corroborar a ideia da partilha de características entre estes dois mediadores gasosos. Contudo, se o processo de activação é semelhante, o mesmo não se pode dizer em termos da magnitude do efeito provocado, isto é, no aumento da produção de cGMP: enquanto o NO pode potenciar a acção da sGC em cerca de 400 vezes, o efeito do CO atinge valores bastante mais modestos potenciando a acção da sGC entre, aproximadamente, 4 a 13 vezes ^{1,3,24,25}.

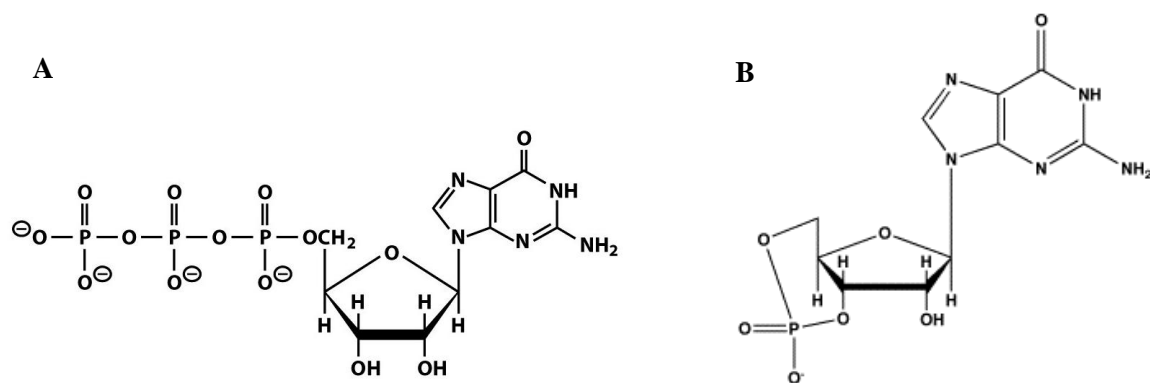


Figura 1.14 – Estruturas de guanósina trifosfato e de guanósina monofosfato cíclica

Adaptado de http://biochem.siuc.edu/web_lessons/bmb_na.htm

A – Guanósina trifosfato (GTP); B – Guanósina monofosfato cíclica (cGMP)

O aumento de cGMP desencadeia várias respostas (Figura 1.15) que levam à redução dos níveis citoplasmáticos de cálcio (Ca^{2+}) designadamente a produção da proteína cinase G (de sigla PKG).

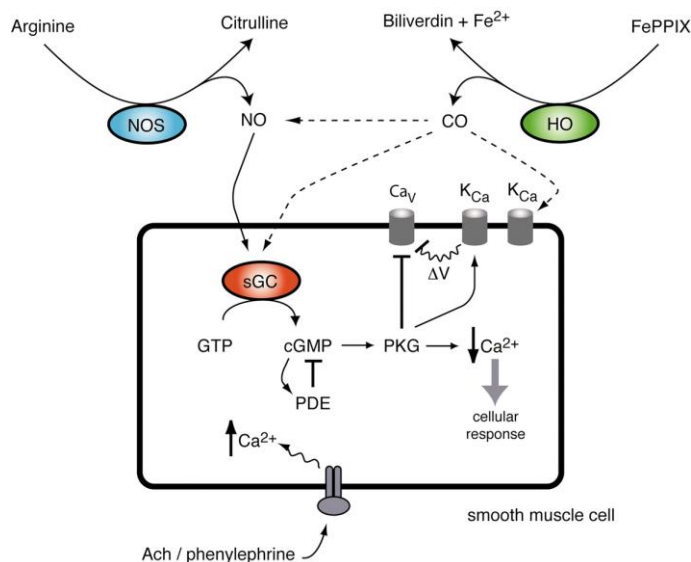


Figura 1.15 – Mecanismos de acção do monóxido de carbono na via sGC/cGMP ²⁴

O CO produzido pela HO (assim como o NO produzido pela NOS) activa a sGC aumentando os níveis de cGMP. O aumento de cGMP leva à diminuição dos níveis de Ca^{2+} através da acção da PKG que inibe os canais de cálcio e estimula os canais de potássio activados por cálcio. O aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} consegue-se pela presença de acetilcolina e de fenilefrina, assistindo-se à degradação do cGMP por PDE.

NOS – Sintase do óxido nítrico; HO – Oxigenase do hemo; NO – Óxido nítrico; CO – Monóxido de carbono; Ca_V – Canais de cálcio; K_{Ca} – Canais de potássio activados por cálcio; sGC - Guanilato ciclase solúvel; GTP – Guanósina trifosfato; cGMP – Guanósina monofosfato cíclica; PKG – Proteína cinase G; Ca^{2+} – Cálcio; PDE – Fosfodiesterases; Ach – Acetilcolina

A PKG fosforila diversos reguladores da concentração celular do Ca^{2+} inibindo os canais de cálcio (de sigla Ca_V) e estimulando os canais de potássio activados por cálcio (de sigla K_{Ca}) da membrana cuja hiperpolarização leva igualmente à inibição dos canais de cálcio. ^{24,25,26}.

Compreensivelmente, a célula precisa de algum mecanismo capaz de regular a produção de cGMP e de mantê-la funcional. A presença de agentes como a acetilcolina (de sigla Ach) e a fenilefrina provocam o aumento dos níveis intracelulares de cálcio que, por sua vez, faz com que o cGMP seja degradado por enzimas denominadas fosfodiesterases (de sigla PDE) restabelecendo-se o equilíbrio inicial ^{24,25,26}.

Ao contrário do que, aparentemente, seria de esperar, assiste-se a diferentes efeitos provocados pelo aumento e pela diminuição dos níveis citoplasmáticos de cálcio consoante o tipo de células.

Este facto encontra-se bem patente nas células do músculo liso vascular e nas células do endotélio (ambas presentes nas paredes dos vasos sanguíneos). Nas primeiras, a redução dos níveis de cálcio pela via sGC/cGMP leva ao seu relaxamento e consequente vasodilatação; paralelamente, a vasodilatação é favorecida pelo aumento de cálcio nas células endoteliais. De referir que a vasodilatação, além de assegurar a perfusão dos tecidos, participa na regulação da temperatura corporal e da pressão sanguínea o que torna possível compreender a sua importância na manutenção da homeostase corporal ^{1,3,24,25}.

1.1.3.1.2 – Via MAPK

Juntando à via sGC/cGMP, o mecanismo melhor caracterizado consiste na acção do CO nas vias de sinalização das proteínas cinases activadas por mitogénios (de sigla MAPK). As vias MAPK são responsáveis pela regulação de processos celulares relevantes (que incluem, a título de exemplo, o crescimento celular, a diferenciação e a apoptose) e possibilitam a transdução de sinal em situações de stress oxidativo e de inflamação ^{1,3}.

Nas células de mamíferos, salientam-se três principais vias de sinalização MAPK: proteína cinase regulada por sinal extracelular (de sigla ERK), p38 MAPK (de sigla p38) e proteína cinase NH₂-terminal c-Jun (de sigla JNK). Cada via alberga várias cinases que exercem a sua acção fosforilando sequencialmente outras cinases de forma a activá-las e a fazer chegar o sinal ao alvo.

O CO consegue modular o funcionamento das vias MAPK originando uma maior ou menor actividade que, por sua vez, está na base dos efeitos biológicos reconhecidos ao CO. Os estudos sobre a influência do CO na via MAPK não se encontram de todo esclarecidos; ainda assim, os dados recolhidos apontam para uma particular acção do CO na via p38 capaz de gerar propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e anti-proliferativas como se pretende demonstrar seguidamente ^{1,3,5}.

A inflamação surge como uma resposta do organismo face a lesões dos tecidos ou a infecções. Embora esteja incluída em mecanismos de defesa inata, a persistência da inflamação é responsável pelo desenvolvimento de patologias variadas. Como tal, torna-se imprescindível a existência de mecanismos capazes de inibir a inflamação nos quais se incluem acções mediadas pelo CO.

De facto, o CO manifesta a capacidade de influenciar a via p38 no sentido da expressão do factor de transcrição *Heat Shock Factor 1* (de sigla HSF1) que, por sua vez, regula a expressão da *Heat Shock Protein 70* (de sigla HSP70). O aumento da concentração de proteínas de choque térmico leva ao decréscimo da expressão de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos – como o Factor de Necrose Tumoral α (de sigla TNF α), a interleucina-1 β (de sigla IL-1 β) e a Proteína Inflamatória de Macrófagos 1- α (de sigla MIP-1 α) – e, deste modo, contribui para a diminuição da inflamação. Adicionalmente, verificou-se igualmente que o CO potencia a produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (de sigla IL-10) auxiliando de forma inequívoca na inibição do processo de inflamação atrás referido^{1,4,27,28}.

Em relação à apoptose, tal como a inflamação, é um mecanismo natural exercendo usualmente funções protectoras ao eliminar, de forma criteriosa, células que condicionam irreversivelmente o funcionamento correcto do tecido (a título ilustrativo, podem-se referir as células com erros graves no DNA e as lesadas por um estímulo externo).

Como expectável, a desregulação da apoptose opõe-se à homeostase do organismo sendo necessário controlá-la. De igual modo, a apoptose pode ser indesejável em procedimentos médicos como a transplantação ao contribuir para a rejeição dos órgãos. Sabe-se que a transplantação pode conduzir a lesões de isquémia/reperfusão (de sigla I/R) que, por seu turno, entram na categoria dos estímulos capazes de despoletar a apoptose (nomeadamente das células do endotélio dos vasos sanguíneos) responsável, em última instância, pela rejeição do órgão.

Torna-se, pois, clinicamente relevante encontrar soluções que permitam superar estas limitações, contribuindo para o desenvolvimento da transplantação e ajudando a salvar numerosas vidas. Mais uma vez, o CO mostra ser um possível aliado ao manter a integridade das células endoteliais quando aplicado a órgãos transplantados (Figura 1.16)^{29,30}. Estes dados sugerem que o CO consegue evitar a apoptose e existem estudos indicativos da capacidade do CO modular a via p38 no sentido da diminuição da expressão de TNF α (também um agente apoptótico) e da interacção com genes anti-apoptóticos que, em conjunto, minimizam o fenómeno da apoptose e, consequentemente, contribuem para o sucesso do transplante^{1,4,27,30}.

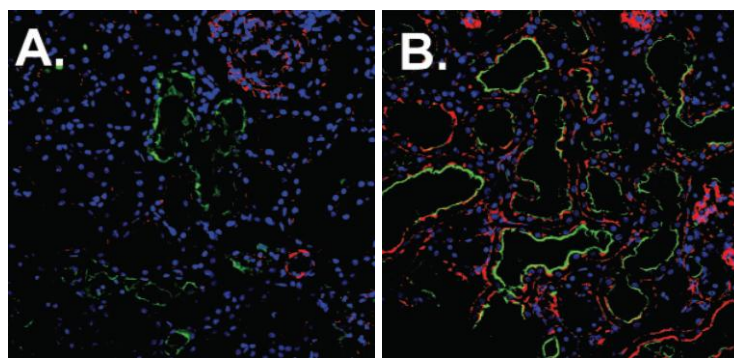


Figura 1.16 – Efeitos do monóxido de carbono na apoptose das células do endotélio ³⁰

O uso de marcadores fluorescentes – CD31 (a verde) e rodamina-paloidina (a vermelho) – permite observar o efeito do monóxido de carbono nas células endoteliais de rim transplantado após uma lesão de isquémia/reperfusão (ampliação de 400 vezes)

A – A amostra controlo (exposta ao ar) apresenta uma expressão baixa e descontínua de CD31 o que demonstra a degradação dos vasos sanguíneos e a provável rejeição do rim

B – Já quando a amostra é tratada com monóxido de carbono, verifica-se a expressão normal de CD31 indicando a preservação dos vasos sanguíneos e consequente aceitação do rim. Tem-se, pois, que o monóxido de carbono exerce um efeito protector face a lesões de isquémia/reperfusão pela inibição da apoptose

Por último, e em uníssono com os processos anteriores, a proliferação celular revela-se um mecanismo natural com um papel óbvio na manutenção das funções normais do organismo. Contudo, e tal como com a apoptose, a sua desregulação desencadeia uma série de respostas anormais que podem incluir o estreitamento dos vasos sanguíneos (provocado pelo crescimento desmesurado das células do músculo liso vascular e denominado estenose vascular) e, em casos mais graves, conduzir a diversos tipos de cancro.

Tomando em consideração que o cancro é seguramente uma das doenças mais exaustivamente investigadas na busca incessante de uma possível cura, torna-se fácil supor que o CO tenha sido testado com tal propósito. De facto, investigações mostram que a aplicação de CO reduz a proliferação celular em diversos tipos de células designadamente em células tumorais, linfócitos T e células do músculo liso vascular (Figuras 1.17 e 1.18) perspectivando uma possível utilização do CO no combate ao cancro. O desenrolar dos estudos indica que a inibição da proliferação celular pelo CO é complexa necessitando de diferentes mecanismos para ser eficaz; acredita-se que a diminuição da proliferação exige o aumento de cGMP e ainda a modulação da via p38 para aumentar a expressão de p21^{cip1} capaz de inibir a proteína cinase dependente de ciclina G1 e, em consequência, impedir a proliferação celular

1,27,31,32

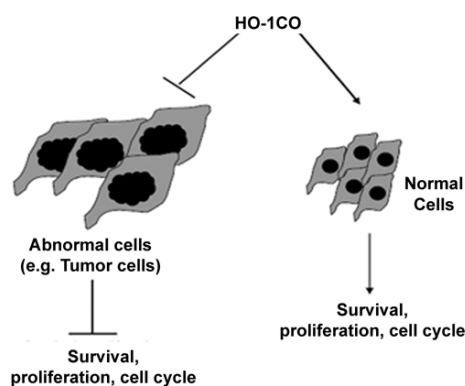


Figura 1.17 – Representação esquemática dos efeitos do monóxido de carbono na proliferação celular ³¹

O normal funcionamento da oxigenase do hemo-1 (HO-1), e consequente formação de monóxido de carbono (CO), revela-se essencial para o correcto funcionamento celular ao nível da proliferação

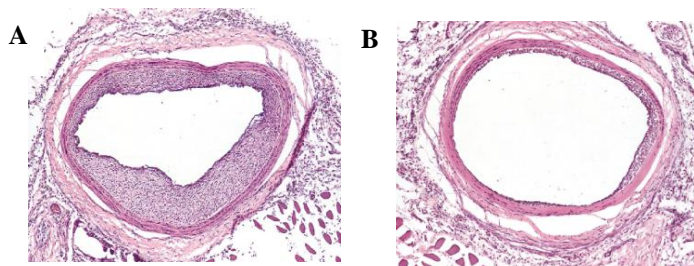


Figura 1.18 – Efeitos do monóxido de carbono na proliferação celular ³²

A – Vaso sanguíneo de rato (exposto ao ar) onde é possível observar uma desregulação da proliferação celular (ampliação de 10 vezes)

B – Aquando da aplicação de CO aos ratos (250 ppm durante 1 hora), assiste-se uma redução significativa da proliferação (ampliação de 10 vezes)

1.1.4 – Administração terapêutica do monóxido de carbono

Tal como exposto nos capítulos anteriores, o monóxido de carbono, muito mais que um tóxico, desempenha um papel essencial no correcto funcionamento celular através da intervenção em diversos processos biológicos.

A análise e o desenrolar das diversas pesquisas envolvendo o CO levaram à formulação da hipótese do seu uso como um agente terapêutico como, de resto, foi já possível acompanhar nos capítulos anteriores no caso dos transplantes. Por outro lado, a aplicação terapêutica do CO parece ser uma opção válida visto que, ao contrário de novos medicamentos sintéticos que iriam exigir estudos adicionais ao nível da clarificação do seu metabolismo, existem já dados concretos sobre o comportamento intracelular do CO e sobre quais as vias despoletadas pelo mesmo ³³.

Deste modo, não existindo dúvidas em relação às propriedades de protecção celular exercidas pelo CO, torna-se indispensável definir o modo de administração tendo sempre em conta que, no caso de algum tipo de desregulação nas doses aplicadas, a acção terapêutica é rapidamente substituída por um efeito tóxico ³³.

Fazendo um ponto de situação, conhecem-se várias propriedades de protecção celular exercidas pelo CO e as observações registadas levam a crer na possibilidade do seu uso farmacêutico (ou, sendo mais preciso, na sua aplicação em testes clínicos passando numa fase posterior ao uso farmacêutico). Infelizmente, a situação não é assim tão simples; a possível toxicidade do CO deve

estar sempre presente e não pode ser negada pelo que o modo de administração requer uma análise minuciosa e cuidada ³³.

Uma abordagem intuitiva, tendo em conta a origem endógena de CO pela oxigenase do hemo, relaciona-se com a estimulação da HO no sentido de aumentar a produção de CO através de manipulação genética ou do uso de substâncias capazes de activar a enzima. Como muitas vezes acontece, a intuição, por si só, não chega e é preciso ponderar os prós e os contras. Para além de ser necessário conhecer pormenorizadamente eventuais fármacos usados na estimulação da HO (possível acção pró-oxidante), se é verdade que o aumento do CO é benéfico no tratamento de algumas patologias, não é menos verdade que a acção da HO faz aumentar de igual forma os níveis de ferro e de bilirrubina que podem atingir valores proibitivos; o mesmo pode acontecer com o próprio CO ultrapassando o limiar de segurança e, ao invés de benéfico, acrescentar apenas novos problemas à situação clínica ³.

Ora se uma das limitações da activação da HO consiste no risco de ultrapassagem do limiar de segurança do CO, parece possível contorná-la se se conseguir um controlo mais eficaz da concentração de CO aplicado. Este controlo pode ser conseguido se, em vez de se manipular a produção endógena, se apostar na aplicação exógena de CO em quantidades previamente concebidas. Admitindo este cenário, é imprescindível definir o modo de aplicação.

A inalação surge como uma opção francamente óbvia atendendo ao estado gasoso do CO. Apresenta, contudo, desvantagens ao nível de aplicabilidade e de segurança por, mais uma vez, poder ser requerida uma elevada concentração de CO e se passar do benefício para a toxicidade. Além disso, não se consegue que o CO exerça funções apenas na área lesada levando à necessidade de empregar maiores concentrações. Estas dúvidas reflectem-se inclusive nos casos publicados: existem estudos indicativos que a inalação de CO por ratos (1000 ppm durante 24 horas) conseguiu diminuir, de modo assinalável, lesões de isquémia/reperfusão cardíaca sem se observarem efeitos colaterais enquanto outras investigações contrariam estes dados e apontam para diferentes valores de tolerância ao CO ^{3,30,33}.

É ainda possível empregar compostos que, não possuindo CO na sua estrutura, ao serem metabolizados no organismo, conseguem sintetizar CO *in vivo*. O exemplo mais exaustivamente estudado prende-se com o diclorometano (de sigla DCM) que, ao ser oxidado no fígado pelo citocromo P450, gera CO (além de dióxido de carbono) mostrando ser eficaz contra lesões em vários órgãos (realce para o fígado) e na protecção contra a rejeição de transplantes ^{3,30,33}. Todavia, esta solução parece não ser uma metodologia totalmente lógica de seguir já que se aumenta o nível de complexidade do metabolismo envolvido no processo de formação de CO acarretando estudos complementares quanto à sua activação e possíveis efeitos indesejados ⁷.

Fazendo um novo ponto de situação, acreditando-se no potencial terapêutico do CO, parece ainda não se ter encontrado um modo ideal de o administrar em situações clínicas. É neste contexto que as Moléculas Libertadoras de Monóxido de Carbono (de sigla CORMs) surgem como uma solução promissora capaz de ultrapassar com sucesso as limitações das metodologias abordadas ¹¹.

1.1.4.1 – Moléculas Libertadoras de Monóxido de Carbono (CORMs)

O início do desenvolvimento das tecnologias relacionadas com os CORMs é relativamente recente datando do início do século XXI sendo o grupo de Roberto Motterlini o principal impulsionador.

O princípio básico dos CORMs é de fácil compreensão: tratando-se de moléculas que possuem CO na sua composição, conseguem transportá-lo ao longo da corrente sanguínea libertando-o nas células ou tecidos afectados ^{11,34,35}.

Atendendo ao princípio básico da actuação dos CORMs, rapidamente se identificam vantagens quando comparado com as metodologias anteriores. Por um lado, enquadrando-se no ideal do controlo da concentração de CO administrada, podem ser desenhados de modo a que se dê uma libertação controlada nos tecidos afectados. Não menos importante, porventura a principal vantagem face à inalação, os CORMs evitam que o CO esteja livre na circulação e, consequentemente, se associe à hemoglobina pelo que o transporte normal de oxigénio não é afectado e o risco de toxicidade sofre uma redução drástica. Destaca-se ainda o facto de não ser necessário activar outras vias para se observar a sua acção como ocorre aquando do uso do DCM ou moléculas semelhantes ^{6,34,35}.

Embora a acção básica dos CORMs seja rapidamente assimilada, o mesmo não se pode dizer em relação à compreensão dos pormenores do processo. A título ilustrativo, os CORMs devem ser estáveis o suficiente para permitir o seu transporte ao longo da corrente sanguínea, mas se esta estabilidade for tal que não se assista à libertação de CO, o CORM é clinicamente inútil pois o CO não exercerá a sua acção terapêutica. Assim, é necessário encontrar um compromisso válido entre estabilidade e actividade.

Numa outra perspectiva, e de modo a existir um controlo na quantidade de CO empregue, a sua libertação deve ocorrer nas áreas afectadas. Mas como se garante que o CORM apenas liberta aí o CO? A resposta a esta questão prende-se com o desenho do próprio composto; embora a perda de CO possa ocorrer naturalmente, o CORM deve ser concebido de modo a ser activado por estímulos químicos ou enzimáticos característicos das patologias em causa (por exemplo, variações de pH) ³⁵.

Assim, é compreensível que os CORMs sejam investigados cuidadosamente de modo a esclarecer por completo o seu funcionamento e possibilitar o seu uso como fármacos.

1.1.4.1.1 – CORMs e metais de transição

Uma das questões primordiais no estudo dos CORMs relaciona-se com a própria identificação de moléculas capazes de libertar CO *in vivo* sendo que, pelas investigações já realizadas, os metais de transição se perfilam como os melhores candidatos. Assim, aproveitando a sua utilização prévia em actividades distintas, desenvolveram-se complexos metálicos de carbonilo (de sigla MCCs) compostos por um metal de transição (como o níquel, o ferro, o manganês, o molibdénio, o cobalto e o ruténio) coordenado com um determinado número de grupos carbonilo (CO) ^{34,35}.

Os MCCs podem-se representar pela fórmula genérica $M(CO)_xL_y$ em que M representa o metal, $(CO)_x$ representa o número de grupos CO e L_y representa o número de ligandos que ajudam a estabilizar o complexo, actuando sobre a sua solubilidade ou até sobre a sua actuação no organismo ³⁵. O grupo de Motterlini demonstrou que alguns MCCs conseguem libertar CO em meios biológicos e exercer um efeito terapêutico o que permitiu desenvolver as metodologias subjacentes aos CORMs ^{36,37}.

A inserção dos MCCs no estudo dos processos relacionados com o CO leva à necessidade de estudos adicionais essencialmente por dois motivos: por um lado, para se conseguir caracterizar inteiramente os efeitos dos metais de transição no organismo; por outro lado, para se perceber se os MCCs possuem as características necessárias ao seu uso como CORMs ^{36,37}.

De facto, os MCCs devem obedecer a certos critérios para poderem ser usados como CORMs. Em primeiro lugar, pensando que os CORMs devem ser utilizáveis no organismo e que este possui uma elevada percentagem de água, os MCCs devem ser preferencialmente hidrosolúveis (de notar, no entanto, que os primeiros CORMs desenvolvidos não se dissolviam em água). Em segundo lugar, como referido anteriormente, a libertação de CO pelo MCC deve dar-se a uma velocidade controlada e localizar-se preferencialmente nos tecidos afectados de modo a não interferir com a distribuição normal do oxigénio. Em terceiro, e último, lugar, é imprescindível avaliar a toxicidade do MCC (antes e depois da libertação do CO) de modo a verificar se o seu uso é compatível com a manutenção da homeostase ^{35,38}.

Deste modo, continuam-se a desenvolver pesquisas conducentes à descoberta e identificação de novos MCCs que, obedecendo às condições supracitadas, possam ser usados como CORMs e que contribuam para a progressão dos conhecimentos na presente área científica.

1.1.4.1.2 – Exemplos de CORMs

Conforme referido, o início do desenvolvimento dos CORMs enquanto transportadores de CO começou há sensivelmente uma década. Desde aí, vários grupos de investigação dedicam-se ao estudo deste campo e foi já possível identificar diversas moléculas capazes de actuar como CORMs. Os CORMs já identificados podem-se dividir em dois grupos: CORMs lipossolúveis (representados pelo CORM-1 e pelo CORM-2) e CORMs hidrossolúveis (representados pelo CORM-3 e pelo CORM-A1)^{34,39}.

Os CORMs lipossolúveis foram os primeiros a serem descobertos, caracterizando-se, tal como o nome sugere, por serem solúveis apenas em solventes orgânicos como o etanol e o dimetilsulfóxido (de sigla DMSO). Salientam-se dois exemplos de CORMs lipossolúveis: o carbonilo de manganês – de fórmula $[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$ e nomeado CORM-1 – e o dicloro tricarbonilo de ruténio (II) – de fórmula $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ e nomeado CORM-2 (Figura 1.19)^{6, 34,39}.

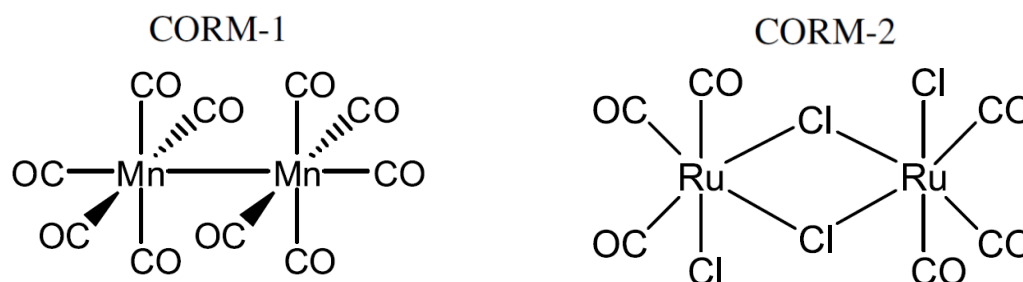


Figura 1.19 – Fórmulas estruturais dos CORMs lipossolúveis: CORM-1 e CORM-2⁶

O CORM-1 possui 2 átomos de manganês como metal de transição enquanto que o CORM-2 apresenta dois átomos de ruténio como metal de transição

O CORM-1 foi o primeiro a ser identificado em 2001 e a sua principal característica reside no facto de necessitar da activação pela luz para conseguir libertar CO. Esta activação ficou bem patente nas pesquisas levadas a cabo com o CORM-1 nas quais se verificaram resultados positivos apenas quando as reacções decorreram sob luz (sinal que o CO se conseguiu libertar do complexo). Adicionalmente, a libertação de CO foi também seguida através da conversão da deoximioglobina em carboximioglobina (de sigla COMb).

As referidas pesquisas mostraram o papel do CORM-1 na vasodilatação ao conseguir diminuir significativamente a constrição induzida artificialmente em corações de rato. Mesmo com as limitações da fotoactivação e de não se conseguir dissolver em água, factores pouco encorajadores para uma actuação satisfatória em sistemas biológicos, as experiências com o CORM-1 tiveram o mérito de permitir a descoberta inicial da possibilidade de se usarem MCCs como agentes terapêuticos sendo justo o reconhecimento da sua importância para o desenvolvimento da área^{34,39,40}.

No ano seguinte, e no sentido de ultrapassar as limitações verificadas até então, identificou-se o CORM-2. De facto, embora não seja solúvel em água, o CORM-2 apresenta já a vantagem da libertação espontânea de CO sem ser necessário recorrer à activação pela luz o que não se verifica no CORM-1: os testes realizados com a formação de COMb foram elucidativos em relação à rapidez da libertação de CO que pode demorar menos de 1 minuto (Figura 1.20) o que indica a libertação de CO^{39,39}. Tal como o seu antecessor, o CORM-2 mostrou possuir propriedades de vasodilatação, mas expandiu a sua acção em mecanismos anti-inflamatórios e de protecção contra lesões de isquémia/reperfusão^{40,41,42}.

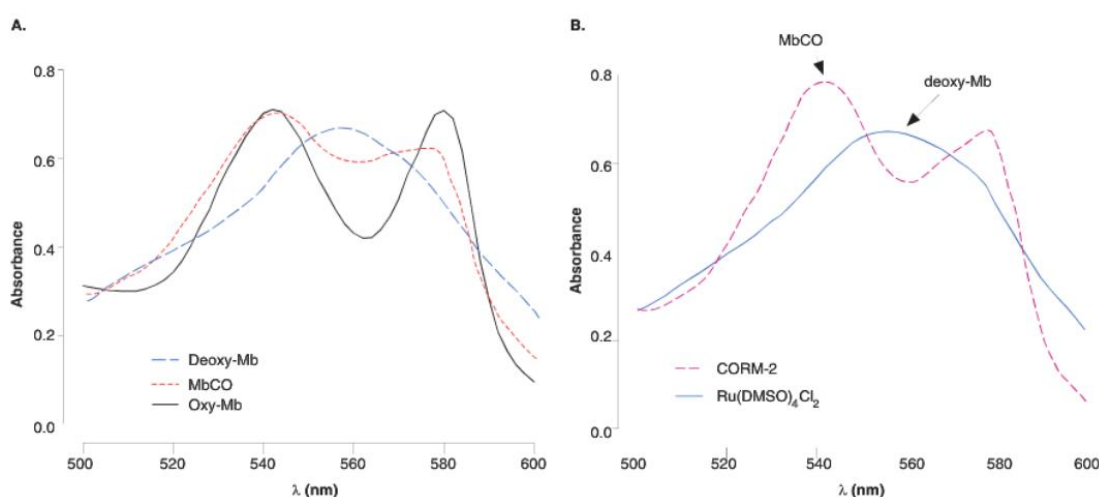


Figura 1.20 – Formação de COMb pela libertação de CO proveniente do CORM-2³⁴

A – Espectros característicos da mioglobina sem ligandos (deoximioglobina), com monóxido de carbono (carboximioglobina) e com oxigénio (oximioglobina)

B – A reacção da mioglobina com o CORM-2 origina um espectro semelhante ao da carboximioglobina o que indica a libertação de CO por parte do CORM-2 e consequente ligação à proteína. Se o CORM-2 for inativado (pela substituição do CO por DMSO), o espectro obtido é semelhante ao da deoximioglobina o que comprova que a formação de carboximioglobina se deve efectivamente ao CO do CORM-2

Já os CORMs hidrossolúveis foram descobertos mais tardiamente tendo surgido como uma resposta natural à necessidade de aproximar o mais possível as características dos CORMs aos sistemas biológicos permitindo avançar para os ensaios clínicos e, caso se obtenham resultados positivos, empregá-los como fármacos. Como já mencionado, a adição de ligandos aos metais de transição auxilia a solubilidade do CORM em água ou soluções aquosas pelo que se colocou ênfase na síntese deste tipo de compostos. Salientam-se dois exemplos de CORMs hidrossolúveis: o cloro tricarbonilo (glicinato) de ruténio (II) – de fórmula $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glicinato})]$ e nomeado CORM-3 – e o boranocarbonato de sódio – de fórmula $[\text{Na}_2\text{H}_3\text{BCO}_2]$ e denominado CORM-A1 (Figura 1.21)^{6, 34,39}.

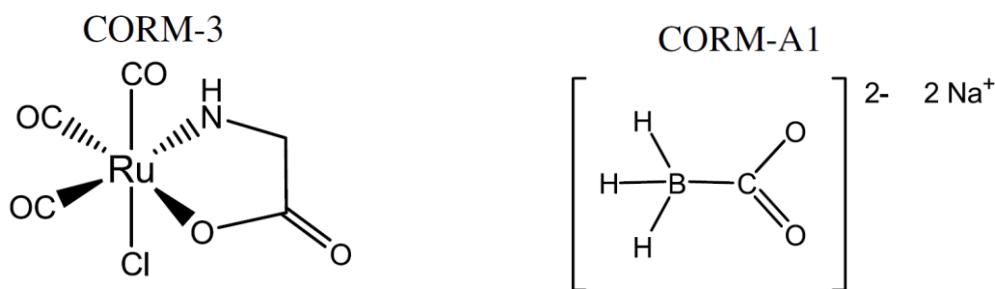


Figura 1.21 – Fórmulas estruturais dos CORMs hidrossolúveis: CORM-3 e CORM-A1 ⁶

O CORM-3 possui ruténio como metal de transição enquanto que o CORM-A1 apresenta boro e um grupo carboxílico em substituição do metal de transição

O CORM-3 foi identificado em 2003; embora contenha ruténio como metal de transição (à semelhança do CORM-2), a adição de glicina à estrutura permitiu aumentar de modo significativo a sua solubilidade em água. Outra semelhança partilhada com o CORM-2 consiste na rápida libertação do CO (tempo de meia vida de, aproximadamente, 1 minuto) que, tal como os casos anteriores, foi seguida através da formação de COMb (Figura 1.22).

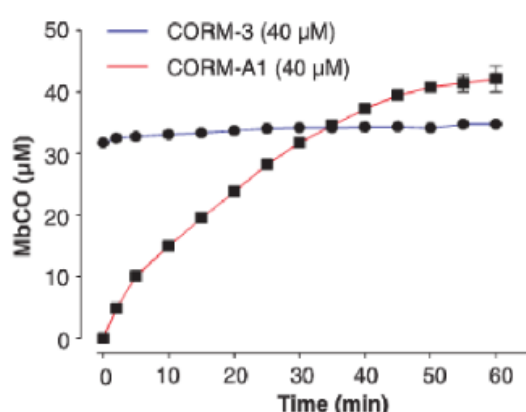


Figura 1.22 – Formação de COMb por acção do CORM-3 e do CORM-A1 ³⁴

Quase imediatamente após a junção do CORM-3 (representado a azul) à mioglobina, assiste-se a uma rápida formação de COMb espelhando a rápida libertação de CO

Por seu turno, a formação de COMb pelo CORM-A1 (representado a vermelho) dá-se de forma gradual ao longo do tempo o que reflecte a lenta libertação de CO

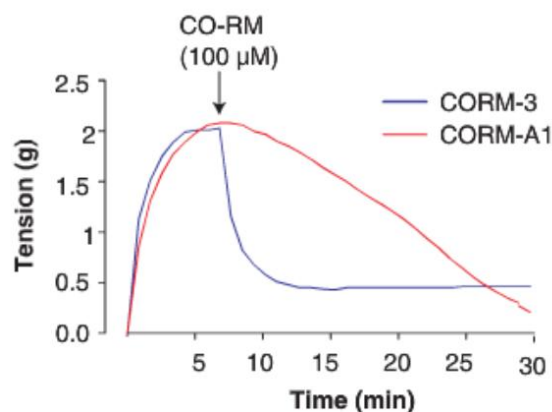


Figura 1.23 – Acção vasodilatadora do CORM-3 e do CORM-A1 na aorta de rato – Adaptado de ³⁴

A aplicação de agentes faz com que a aorta aumente a sua a contracção. O CORM-3 (representado a azul) mostra sinais de vasodilatação súbita quase imediatamente após a sua administração enquanto que a acção vasodilatadora do CORM-A1 (representado a vermelho) faz-se sentir ao longo do tempo de uma forma gradual

Reflectindo a velocidade de libertação do CO, pesquisas efectuadas apontam para a capacidade do CORM-3 em induzir uma grande relaxação dos vasos sanguíneos apenas alguns momentos após a administração do composto (Figura 1.23) ^{34,39}. Adicionalmente ao efeito de vasodilatação, o CORM-3 exhibe igualmente efeitos anti-inflamatórios e de protecção cardíaca (por exemplo, ao nível de lesões de isquémia/reperfusão e de transplantação) o que, juntando às suas propriedades químicas, faz com que seja um dos CORMs em que se depositaram maiores esperanças quanto à sua passagem a fármaco ^{41,43}.

Por último, o CORM-A1 foi identificado mais recentemente em 2004. Sendo hidrossolúvel, a principal diferença face a todos os CORMs anteriormente citados reside no facto de não possuir nenhum metal de transição na sua estrutura; em sua substituição, apresenta boro e um grupo carboxílico que, de acordo com o pH do meio, liberta CO. Distingue-se ainda do CORM-3 pela lenta libertação do CO (tempo de meia vida de 21 minutos) como se observa na formação gradual de COMB ao longo do tempo (Figura 1.22).

Exibindo diferenças ao nível estrutural comparativamente ao CORM-3, o CORM-A1 mostrou partilhar as propriedades de vasodilatação, embora actue de forma mais lenta e progressiva (Figura 1.23) o que sugere que possa ter aplicações terapêuticas em doenças crónicas ^{34,39,44}.

Assim, analisando os exemplos apresentados, facilmente se percebe as potencialidades dos CORMs enquanto agentes terapêuticos pelo que se continua a investir fortemente na descoberta de novos compostos de modo a possibilitar a entrada em testes clínicos e, numa fase posterior, o seu uso como fármacos ^{45,46,47}.

1.1.4.1.3 – Interacções entre CORMs e proteínas do plasma

Como mencionado anteriormente, a síntese e a caracterização de compostos que possam actuar como CORMs encontram-se em franco desenvolvimento. Esta pesquisa torna-se ainda mais importante devido ao facto de nem todos os CORMs identificados poderem ser usados como fármacos.

De facto, o uso dos CORMs como fármacos encontra-se dependente da observação de certos pressupostos. Além dos já enumerados aquando da abordagem aos MCCs (serem solúveis em água, com uma libertação controlada do CO nos tecidos lesados e possuírem uma toxicidade inexistente ou desprezável), deve-se ainda acrescentar a exibição de um perfil farmacocinético adequado *in vivo* (por exemplo, não se verificando o transporte do CORM até à zona de interesse no organismo, o composto será inútil do ponto de vista farmacológico) ^{35,38}.

Como tal, não se pode descurar a investigação destas propriedades aquando da caracterização dos CORMs. Se parte das características supracitadas são alcançadas aquando do desenho do CORM, existem outras que dependem das reacções ocorridas no próprio organismo; entre as primeiras incluem-se a escolha do metal de transição e dos ligandos (influenciando, respectivamente, a toxicidade e a solubilidade) enquanto que nas segundas se salienta a farmacocinética do composto ^{35,48}.

A farmacocinética pode-se definir como o estudo sistemático do percurso de dado xenobiótico no organismo compreendendo quatro etapas: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (de sigla ADME) ⁴⁹. Pensando no facto dos xenobióticos atingirem os tecidos lesionados através da corrente

sanguínea, torna-se lógico admitir que os mecanismos de ADME são influenciados pelas condições verificadas no sangue onde se evidencia a presença de proteínas plasmáticas ⁴⁸.

Constituindo aproximadamente entre 6 a 8% do conteúdo plasmático, as proteínas presentes no plasma – destacando-se a albumina e a transferrina – desempenham um papel inegável no perfil de ADME dos CORMs por razões distintas. Por um lado, atendendo à capacidade natural das proteínas plasmáticas estabelecerem ligações com substâncias presentes na circulação, é imprescindível caracterizar bem tais interacções já que estas determinam a concentração de CORM disponível para exercer o seu efeito terapêutico (ao ligar-se com grande afinidade às proteínas, a concentração do composto livre em circulação diminui com a consequente diminuição da biodisponibilidade). Por outro lado, as proteínas plasmáticas permitem a estabilidade dos CORMs ao longo da corrente sanguínea impedindo-os de se desintegrarem com a consequente ligação do CO libertado à hemoglobina ^{35,48}.

Além dos efeitos descritos na distribuição, não se deve ainda ignorar que a ligação dos CORMs às proteínas plasmáticas faz com que a sua excreção diminua (apenas se dá para as moléculas livres) e que os compostos continuem em circulação reduzindo a necessidade de altas concentrações de CORM para o efeito pretendido ⁴⁸.

Assim, o estudo organizado e sistemático das interacções estabelecidas entre os vários CORMs e as proteínas plasmáticas, assim como com a hemoglobina, pode ajudar a esclarecer o mecanismo de actuação *in vivo* dos compostos e constituir uma ferramenta essencial na determinação dos CORMs potencialmente viáveis para o uso como fármacos.

Tal estudo encontra-se ainda nas suas etapas iniciais embora tenham sido já obtidos resultados encorajadores em relação à interacção do CORM-3 com várias proteínas ⁵⁰. Saliente-se o importante papel que a Cristalografia de Raios-X pode desempenhar neste tipo de pesquisa já que permite acompanhar ao nível atómico as interacções estabelecidas entre CORMs e as proteínas de interesse.

1.2 – Cristalografia de Raios-X

O conhecimento da estrutura tridimensional das proteínas revela-se importante para a compreensão da sua função biológica. Embora com o advento de metodologias alternativas como a Ressonância Magnética Nuclear (de sigla RMN) e a Microscopia Electrónica a Temperatura Criogénica (de sigla Crio-EM), a técnica por excelência de determinação estrutural é ainda a Cristalografia de Raios-X.

De facto, as estatísticas da base de dados *Protein Data Bank* (de sigla PDB) mostram que, das 75694 estruturas depositadas no início de Setembro de 2011, 66075 foram determinadas recorrendo à

Cristalografia de Raios-X o que corresponde a cerca de 87% do número total de estruturas existentes ⁵¹.

Este domínio é, em parte, justificado pelo facto da Cristalografia ter sido, entre as técnicas apresentadas, a primeira a ser identificada nos inícios do século XX; em 1934, Bernal e Crowfoot conseguiram os primeiros padrões de difracção (usando cristais de pepsina) embora as primeiras estruturas de proteínas tenham surgido apenas na década de 60 com os trabalhos de John Kendrew e de Max Perutz sobre a mioglobina e a hemoglobina. Paralelamente, nos últimos anos, o desenvolvimento de *softwares* informáticos empregues na recolha de dados e na resolução de estruturas possibilitou um grande aumento do número de entradas no PDB resolvidas por Cristalografia ^{52,53}.

O uso da Cristalografia em estudos estruturais justifica-se pelo facto dos raios-X possuírem um comprimento de onda compreendido entre 0.1 e 100 Å (0.01 e 10 nm, respectivamente) no espectro electromagnético (Figura 1.24) situando-se na zona dos comprimentos de ligação entre os átomos. Este facto faz com que moléculas, quando agrupadas num cristal, produzam difracção e, a partir desta, se consiga determinar um modelo tridimensional para a molécula em estudo (Figura 1.25) ⁵⁴.

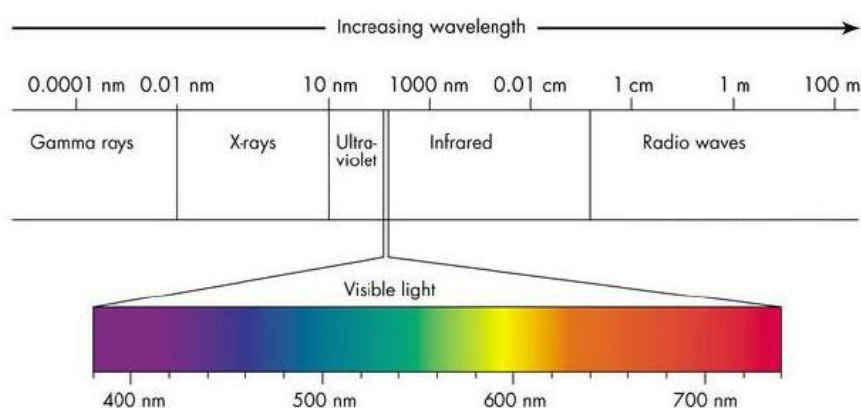


Figura 1.24 – Espectro electromagnético

Adaptado de:

http://www.antonine-education.co.uk/physics_gcse/Unit_1/Topic_5/topic_5_what_are_the_uses_and_ha.htm

Os raios-X possuem um comprimento de onda situado entre 0.1 e 100 Å o que os torna adequados para a difracção de proteínas e outras biomoléculas

A Cristalografia de Raios-X permite a caracterização estrutural de pequenas moléculas (como sais ou moléculas orgânicas), mas também de grandes moléculas como proteínas ou até complexos proteína-ligando. Esta técnica desempenha um papel importante no desenvolvimento de medicamentos ao conseguir fornecer indicações sobre as interacções que estabelecem com as proteínas existentes no organismo e, consequentemente, contribuir para a optimização dos fármacos ^{52,55,56}. Neste contexto, como referido no capítulo anterior, rapidamente se compreende as potencialidades do uso da Cristalografia de Raios-X no estudo das interacções entre os CORMs e as proteínas sanguíneas.

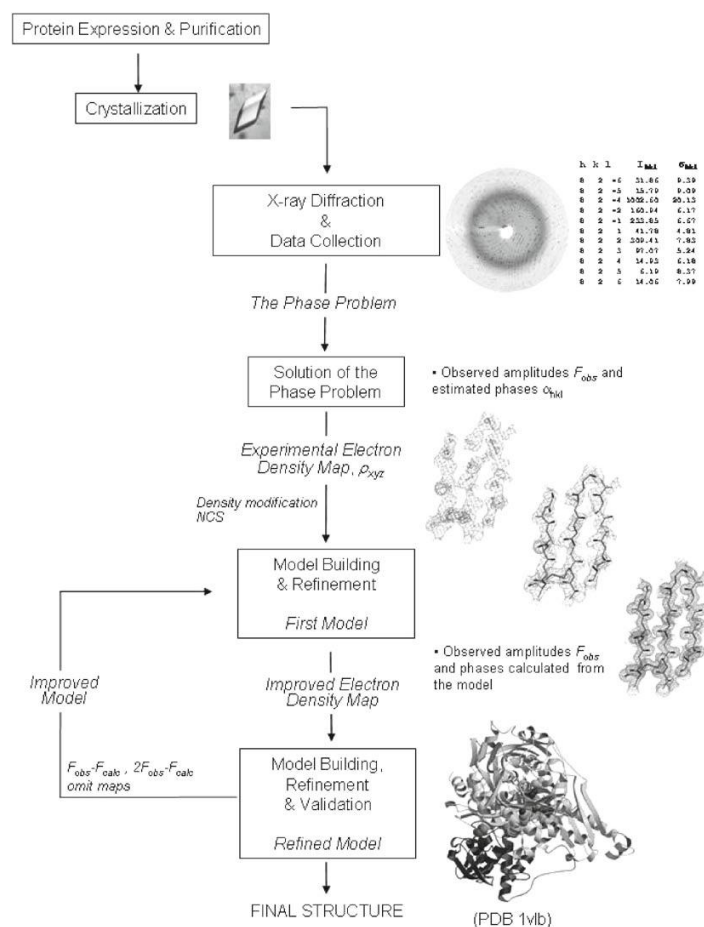


Figura 1.25 – Esquema dos principais passos empregues em Cristalografia de Raios-X desde a cristalização até à obtenção da estrutura final⁵⁴

Após se conseguir cristalizar a proteína de interesse, os cristais são submetidos a experiências de difração recolhendo-se os dados experimentais na forma de padrões de difração. É então necessário resolver o “Problema da Fase” para se conseguir construir o primeiro modelo tridimensional da proteína posteriormente alvo de refinamento e de validação até se chegar à estrutura final

1.2.1 – Cristais e cristalização de proteínas

Um cristal caracteriza-se por ser uma entidade sólida ordenada e periódica no espaço tridimensional. Contrariamente aos cristais de sais inorgânicos, os cristais de proteínas possuem um tamanho reduzido (geralmente inferior a 1 mm) e a sua estrutura é mantida por pontes de hidrogénio. Estas são estabelecidas entre resíduos superficiais da proteína e mediadas por moléculas de água pelo que possuem elevados teores de solvente (compreendidos entre 30% e 70% do volume total do cristal) o que, por sua vez, contribui para a sua fragilidade^{52,54}.

Por outro lado, um cristal é internamente constituído pela repetição das suas unidades mais simples designadas por células unitárias (Figura 1.26). Deste modo, a célula unitária consiste no menor elemento necessário para, através de operações de translação, gerar a rede cristalina, sendo responsável pela simetria do cristal. Por outro lado, associado à célula unitária, surge o conceito de

unidade assimétrica que se define como a menor unidade capaz de gerar a célula unitária através de operações de simetria cristalográfica traduzidas no grupo espacial do cristal (Figura 1.26)^{52,54}.

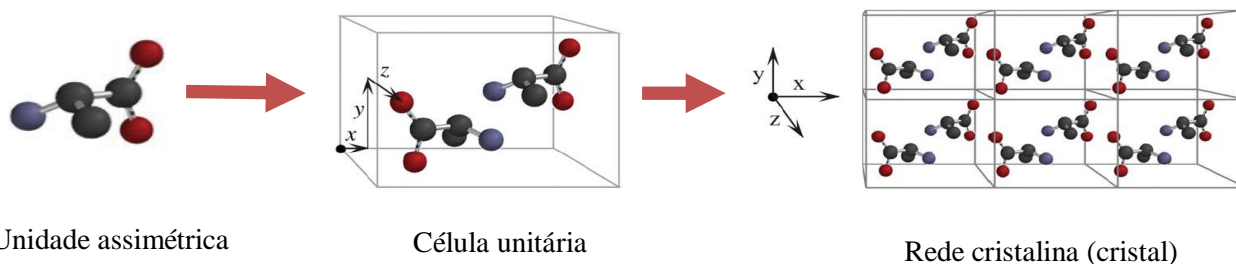


Figura 1.26 – Representação esquemática da unidade assimétrica, da célula unitária e da rede cristalina – Adaptado de⁵⁴

Por operações de simetria cristalográfica, a unidade assimétrica gera a célula unitária que, por sua vez, através de operações de translação, gera a rede cristalina que se repete de forma ordenada no espaço tridimensional

A célula unitária é definida pelos parâmetros ou constantes da célula: três vectores (a , b , c) e três ângulos (α , β , γ) (Figura 1.27). O conhecimento dos parâmetros da célula torna-se importante já que a sua variação origina diferentes sistemas cristalinos, ou seja, diferentes organizações internas do cristal (Figura 1.28).

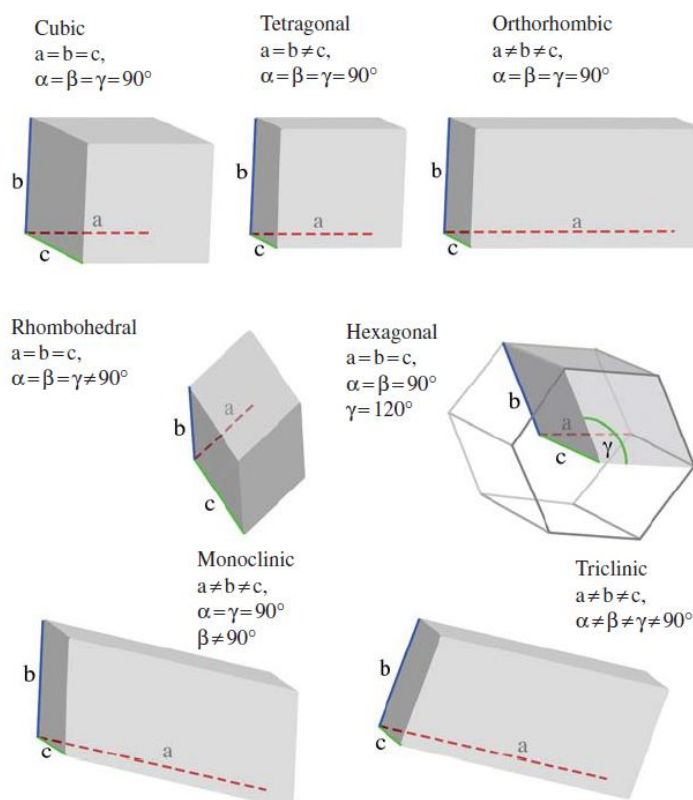
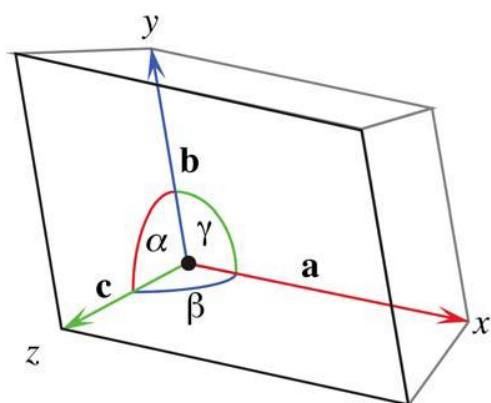


Figura 1.27 – Representação esquemática de uma célula unitária e das respectivas constantes da célula⁵⁴

A célula unitária é caracterizada por três vectores – a , b , c – e por três ângulos – α (entre b e c), β (entre a e c), γ (entre a e b)

Figura 1.28 – Representação esquemática dos sete sistemas cristalinos⁵⁴

De acordo com as constantes da célula unitária, os cristais possuem diferentes organizações internas que se traduzem nos sete sistemas cristalinos distintos

A obtenção de cristais de qualidade é, pois, o passo limitante da Cristalografia de Raios-X pelo que a cristalização (processo no qual se assiste ao arranjo ordenado das moléculas da proteína) é fundamental no sucesso dos estudos desenvolvidos. De um modo geral, a cristalização consegue-se pela adição de uma solução precipitante à proteína pura de modo a que esta passe lentamente para uma fase sobressaturada, isto é, encontrando-se acima do seu limite de solubilidade ⁵⁷.

De facto, a análise do diagrama de fases da cristalização (Figura 1.29) revela a existência de duas grandes regiões: não saturada (onde não é possível ocorrer cristalização) e sobressaturada (onde se pode verificar cristalização). Por sua vez, esta última região pode-se dividir em três zonas de acordo com o crescente grau de sobressaturação: região metaestável, região lábil e região precipitante ^{54,57}.

Tal conhecimento torna-se importante uma vez que a cristalização ocorre em duas etapas: nucleação e crescimento. A nucleação é o processo correspondente à formação de pequenos *clusters* ou núcleos que, na etapa de crescimento, aumentam de volume originando o cristal. A nucleação dá-se unicamente na região lábil sendo que, após a sua ocorrência, se verifica uma redução da concentração de proteína ou de agente precipitante conducente à entrada na região metaestável onde se dá exclusivamente o crescimento lento e ordenado dos cristais. Já na região precipitante, apenas se verifica a formação de um sólido amorfo (designado por precipitado) que não pode ser usado nas experiências posteriores ^{54,57,58}.

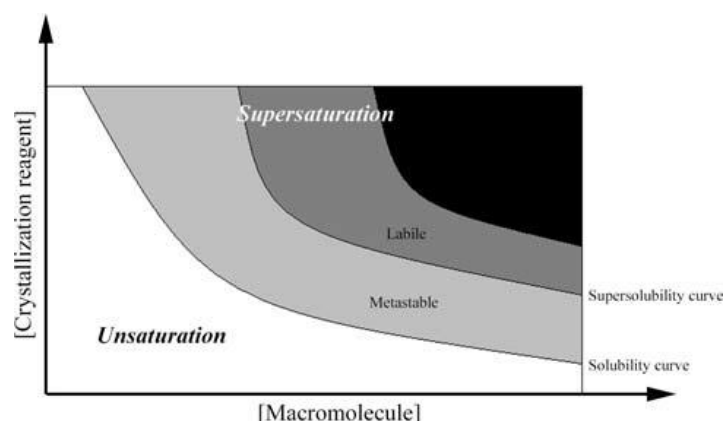


Figura 1.29 – Diagrama de fases da cristalização ⁵⁷

De acordo com a concentração de proteína e de agente precipitante, verifica-se a existência de uma região não saturada (branco) e de outra sobressaturada (gradiente de cinzentos). A cristalização apenas ocorre na região sobressaturada que se divide em metaestável (cinzento claro), lábil (cinzento escuro) e precipitante (preto): a nucleação ocorre exclusivamente na zona lábil enquanto o crescimento é favorecido na zona metaestável

Existem diferentes técnicas de cristalização, mas a mais comumente empregue é a difusão de vapor na qual uma gota de solução de proteína com solução precipitante (podendo-se usar diferentes proporções entre proteína e precipitante) é colocada num recipiente fechado que engloba um reservatório com a solução precipitante de modo a estabelecer-se um equilíbrio entre a gota e a solução precipitante do reservatório ^{54,59}.

A difusão de vapor compreende os métodos de gota suspensa (*hanging drop*) em que a gota é colocada numa lamela situada acima do reservatório (Figura 1.30) e de gota assente (*sitting drop*) na qual a gota é colocada numa microponte situada no reservatório (Figura 1.31). Embora com as diferenças descritas, os dois métodos partilham o mesmo princípio.

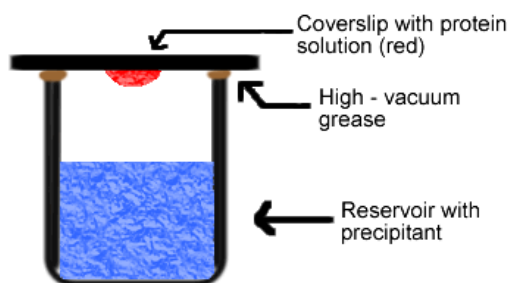


Figura 1.30 – Representação esquemática da técnica de gota suspensa *in*

<http://www.bio.davidson.edu/courses/MolBio/MolStudents/spring2003/Kogoy/protein.html>

Neste método, a gota com proteína e solução precipitante é colocada numa lamela ficando suspensa sobre o reservatório

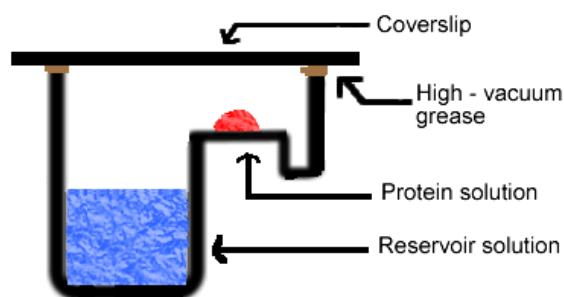


Figura 1.31 – Representação esquemática da técnica de gota assente *in*

<http://www.bio.davidson.edu/courses/MolBio/MolStudents/spring2003/Kogoy/protein.html>

Neste método, a gota com proteína e solução precipitante é colocada numa microponte localizada no reservatório

O reservatório é selado com uma lamela e com cera ou silicone de modo a criar uma atmosfera controlada em que, tendo em conta o facto do reservatório possuir uma maior concentração de solução precipitante quando comparado com a gota, se estabelece a difusão de vapor. Por sua vez, a difusão de vapor faz com que as moléculas de água abandonem a gota de modo a atingir-se o equilíbrio, ou seja, igual concentração de precipitante na gota e no reservatório. Tem-se, pois, que o estabelecimento do equilíbrio conduz à redução do volume da gota que, por seu turno, leva à sobressaturação da proteína e possibilita a sua cristalização^{54,57, 59}.

As condições de cristalização variam de proteína para proteína sendo determinadas através de ensaios de varrimento inicial (também designados por ensaios de *screening*) nos quais se testam diversas condições experimentais como a concentração da proteína, a natureza e concentração dos agentes precipitantes (por exemplo, sais e polietilenoglicóis, de sigla PEG, com vários pesos moleculares), o pH e a temperatura (usualmente realizam-se ensaios a 4 °C e a 20 °C já que a temperatura influencia a velocidade de cristalização)⁵².

1.2.2 – Resolução da estrutura

Após o sucesso da cristalização, procede-se à realização da experiência de difracção fazendo incidir sobre o cristal um feixe de raios-X. Estes interagem com os electrões das moléculas da proteína e originam um padrão de difracção com as reflexões características da organização interna do cristal

(Figura 1.32). Saliente-se ainda a necessidade prévia de proceder ao congelamento dos cristais (recorrendo-se a azoto líquido) para minimizar os danos provocados pela incidência da radiação ^{54,55}.

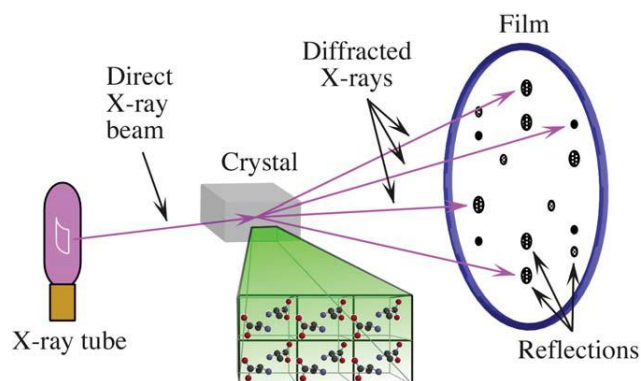


Figura 1.32 – Representação esquemática de uma experiência de difracção ⁵⁴

Ao fazer-se incidir um feixe de raios-X no cristal, a radiação é difractada de diferentes modos originando um padrão de difracção (cujo espaço imaginário é designado por espaço recíproco) contendo as reflexões que possuem informação sobre a organização interna do cristal

Sabe-se que as ondas difractadas podem obedecer a fenómenos de interferência construtiva ou de interferência destrutiva, isto é, podem-se somar ou anular. No entanto, apenas as reflexões que interferem construtivamente são detectadas no padrão de difracção (Lei de Bragg) sendo estas caracterizadas pelos índices hkl no espaço recíproco (Índices de Miller) e pela respectiva intensidade (I_{hkl}) ⁵⁴.

Deste modo, cada reflexão representa uma onda difractada, caracterizada por três parâmetros: comprimento de onda (representado por λ), amplitude (representada por F) e fase (representada por α) de acordo com o representado na Figura 1.33.

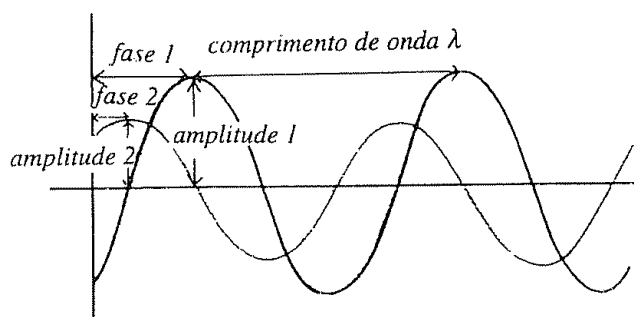


Figura 1.33 – Caracterização esquemática das ondas difractadas: comprimento de onda, amplitude e fase ⁵²

Do ponto de vista matemático, as ondas difractadas (ou seja, as reflexões) constituem um exemplo de função periódica pelo que podem ser descritas como uma série de Fourier através da equação dos Factores de Estrutura (de sigla F_{hkl}). Assim, F_{hkl} (englobando o comprimento de onda, a amplitude e a fase) descreve o modo como o cristal difracta os raios-X de acordo com a sua organização interna, isto é, de acordo com a posição dos átomos representada pela densidade electrónica (de sigla $\rho(x,y,z)$) ^{52,55}.

Torna-se, pois, possível descrever F_{hkl} através da seguinte fórmula (em que V representa o volume da célula unitária):

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{[2\pi i(hx + ky + lz)]} dV$$

Atendendo a que a transformada de Fourier é uma operação reversível, é igualmente possível descrever a densidade electrónica em função dos Factores de Estrutura através da seguinte fórmula ^{52,54,55}:

$$\rho(x, y, z) = \sum_{h,k,l} |F_{hkl}| \cdot e^{-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})}$$

A densidade electrónica, como o nome sugere, descreve a localização dos electrões na célula unitária permitindo, como referido, a determinação das posições dos átomos (coordenadas no espaço real x, y, z). Analisando a fórmula anterior, verifica-se que a densidade electrónica pode ser calculada conhecendo-se dois factores: a amplitude de F_{hkl} (representada por $|F_{hkl}|$) e a fase; experimentalmente, consegue-se determinar $|F_{hkl}|$ visto que corresponde, aproximadamente, à raiz quadrada da intensidade das reflexões, mas não é possível conhecer o ângulo da fase o que leva ao denominado “Problema da Fase” em Cristalografia ^{52, 55}.

A resolução do “Problema da Fase” passa pela utilização de diferentes métodos que levem à determinação das fases aproximadas. No caso de não existirem estruturas homólogas, a inclusão de átomos pesados e a dispersão anómala possibilitam tal determinação através de métodos como a Substituição Isomórfica Múltipla (de sigla MIR do inglês *Multiple Isomorphous Replacement*) e a Dispersão Anómala Múltipla (de sigla MAD do inglês *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*) ⁵⁴.

Todavia, no caso de existirem já estruturas homólogas resolvidas (ou seja, que sejam estruturalmente semelhantes à proteína de interesse), recorre-se ao Método de Substituição Molecular (de sigla MR do inglês *Molecular Replacement*) no qual se usam as fases do modelo conhecido para determinar as fases da proteína em estudo. A Substituição Molecular compreende dois passos: rotação e translação. Na rotação consegue-se encontrar a orientação da estrutura conhecida na célula unitária da nova estrutura enquanto que na translação se consegue o correcto posicionamento da estrutura conhecida na célula unitária da nova estrutura ^{52, 55}.

Tem-se, pois, que o uso das fases da estrutura homóloga e das amplitudes da estrutura em estudo, permite a obtenção de um primeiro mapa de densidade electrónica usado para a construção do modelo e sujeito a refinamento de modo a originar um modelo tridimensional inicial da proteína.

Este modelo inclui já coordenadas x, y, z pelo que pode ser alvo de uma nova transformada de Fourier para a obtenção de fases de melhor qualidade usadas para melhorar a densidade electrónica e

permitindo novos passos de construção e de refinamento; este ciclo é repetido as vezes necessárias até se conseguir obter um modelo capaz de explicar satisfatoriamente os dados experimentais ^{52, 55}.

1.2.3 – Refinamento da estrutura

Conforme referido anteriormente, a resolução de uma estrutura é um processo iterativo em que se procura melhorar progressivamente as fases. Como tal, os modelos iniciais apresentam erros que vão sendo eliminados através do processo de refinamento cristalográfico.

Assim, durante o refinamento, procura-se ajustar o modelo construído à densidade electrónica no sentido de conseguir minimizar as diferenças entre as amplitudes observadas ($|F_{obs}|$ ou $|F_c|$) e as amplitudes calculadas ($|F_{calc}|$ ou $|F_c|$) ^{52, 55}.

Consequentemente, estabeleceram-se alguns parâmetros de qualidade do refinamento de modo a verificar-se se a estrutura obtida possui ou não significado real. O parâmetro mais importante consiste no factor R que traduz a concordância entre o modelo construído e os dados experimentais de acordo com a seguinte fórmula:

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

Assim, o factor R deve ser o menor possível o que, analisando a fórmula, se traduz pela proximidade entre os valores de $|F_{obs}|$ e de $|F_{calc}|$ conforme pretendido. No caso das proteínas, valores superiores a 0.50 indicam uma estrutura aleatória enquanto que valores inferiores a 0.20 apontam, globalmente, para uma boa resolução da estrutura ^{52,53,54}.

Introduzido mais recentemente, o R_{free} constitui outro parâmetro de refinamento importante; é calculado de forma análoga ao factor R, mas usa cerca de 1000 reflexões (entre 5 a 10%) excluídas do refinamento permitindo seguir a evolução do factor R: a introdução de dados incorrectos no modelo (por exemplo, a adição de átomos inexistentes na estrutura cristalina) pode fazer diminuir o factor R, mas não o R_{free} .

Deste modo, caso o modelo construído continue a explicar correctamente os dados experimentais, os valores do factor R e do R_{free} devem-se manter aproximados entre si com o último a apresentar, geralmente, um acréscimo até 0.05 em relação ao primeiro. Se esta diferença for muito maior que 0.05, algum parâmetro introduzido no modelo pode não corresponder à realidade sendo muitas vezes necessário reformulá-lo ^{52,53, 55}.

De referir que tanto o factor R como o R_{free} descrevem unicamente os erros globais do modelo, mas não os erros locais. Este facto significa que, mesmo conseguindo-se valores adequados para os parâmetros citados, podem existir zonas do modelo com erros associados. A detecção de tais erros consegue-se pelo recurso a um outro parâmetro designado por factor de temperatura ou factor B. O

factor B traduz a vibração de dado átomo em relação à sua posição possibilitando, por um lado, a determinação da mobilidade relativa dos átomos e, por outro lado, a detecção de erros no modelo; se dado átomo se encontrar numa posição incorrecta, o seu factor de temperatura irá ser mais elevado que os dos átomos próximos^{52,53}.

Quando se considera que o modelo construído explica de modo satisfatório os dados experimentais, depois de passar por vários filtros de validação, é, por fim, depositado no PDB.

1.3 – Proteínas em estudo

No trabalho experimental conducente à elaboração da presente Dissertação, empregaram-se quatro proteínas distintas nos estudos realizados pelo que se torna importante caracterizar brevemente cada uma delas.

1.3.1 – Lisozima

A lisozima foi primeiramente identificada, em 1922, por Alexander Fleming⁶⁰; verificando-se a existência de diferentes tipos de lisozima no Reino Animal, salienta-se o tipo *c* no qual se inclui a lisozima da clara de ovo. Esta enzima, com 129 aminoácidos e cerca de 14400 Da, constitui o modelo proteico por excelência nos estudos de Cristalografia de Raios-X tendo sido, inclusive, a primeira enzima cuja estrutura tridimensional foi resolvida por Cristalografia (graças aos trabalhos de D. C. Phillips, em 1966)⁶¹.

Encontrando-se em diversos fluídos biológicos (destacando-se as lágrimas e a saliva) e tecidos (nomeadamente ao nível das vias aéreas e do intestino), a lisozima participa em mecanismos de defesa imunológica ao conseguir hidrolisar o peptidoglicano e, consequentemente, degradar a parede celular de algumas bactérias⁶¹.

1.3.2 – Hemoglobina

A hemoglobina foi identificada nos meados do século XIX, mas a sua estrutura apenas foi resolvida por Cristalografia de Raios-X cerca de um século mais tarde, em 1959, com os trabalhos de Max Perutz⁶².

Encontrando-se nos glóbulos vermelhos, trata-se de uma proteína tetramérica com 2 cadeias α (cada uma com 141 aminoácidos) e duas cadeias β (cada uma com 145 aminoácidos) e com um peso molecular de, aproximadamente, 64500 Da. Cada cadeia possui um grupo hemo capaz de transportar o

oxigénio dos pulmões até aos vários tecidos assistindo-se a um mecanismo alostérico onde a ligação da primeira molécula de oxigénio à proteína, facilita a ligação das restantes três moléculas ⁶².

1.3.3 – Albumina

A albumina representa cerca de metade do material proteico existente no plasma. É uma proteína de 585 aminoácidos e com um peso molecular de 66500 Da. Sendo alvo de estudos há largas décadas, apenas desde há cerca de 20 anos se conseguiu obter a sua estrutura a altas resoluções por Cristalografia de Raios-X.

Produzida no fígado, a albumina é uma proteína solúvel em água caracterizando-se por contribuir para a homeostase (através, por exemplo, da captura de ROS), embora o principal papel atribuído se relacione com a capacidade de ligação a várias moléculas (de origem endógena ou exógena como medicamentos) tornando possível o seu transporte ao longo da corrente sanguínea até às zonas de actuação ^{63,64}.

1.3.4 – Transferrina

O termo transferrina designa uma família de proteínas responsáveis pelo transporte de ferro férrico (Fe^{3+}) até às células destacando-se a transferrina do soro que se encontra no sangue. Trata-se de uma proteína com cerca de 700 aminoácidos (correspondendo a um peso molecular de, aproximadamente, 80000 Da) sendo possível detectar dois lóbulos homólogos – lóbulo do N-terminal e do C-terminal – ligados por uma secção helicoidal.

Os dois lóbulos partilham a mesma organização: dois domínios que rodeiam uma grande abertura onde se situa o local de ligação ao ferro. Cada lóbulo consegue transportar uma molécula de ferro e, embora difiram em alguns aspectos, o seu funcionamento é semelhante entre si pelo que o estudo de um dos lóbulos é suficiente para se concluir acerca do funcionamento da proteína ^{65,66}.

2. – Objectivos

Com a realização do presente trabalho experimental, pretendeu-se estabelecer um estudo sistemático sobre as interacções estabelecidas entre variados compostos com potencial para serem usados como CORMs fornecidos pela empresa Alfama e diferentes proteínas: lisozima, hemoglobina, albumina e transferrina. A selecção da lisozima deveu-se ao facto de ser um excelente modelo nos estudos cristalográficos enquanto que a escolha das restantes proteínas se deveu ao papel que podem desempenhar no transporte e no mecanismo de acção dos CORMs ao longo da corrente sanguínea. Para averiguar as possíveis interacções entre as proteínas e os compostos utilizaram-se as seguintes técnicas: Cristalografia de Raios-X, Espectroscopia Ultra-Violeta/Visível e Espectroscopia de Infra-vermelhos.

Para a lisozima, pretendeu-se caracterizar as interacções entre a proteína e os compostos ALF 554 e ALF 850 através das metodologias subjacentes à Cristalografia de Raios-X e à Espectroscopia de Infra-vermelhos.

Quanto à hemoglobina, teve-se por fim averiguar as interacções estabelecidas entre a proteína e os compostos ALF 186, ALF 475, ALF 486, ALF 487, ALF 554, ALF 794 e ALF 850 por Cristalografia de Raios-X. Adicionalmente, pretenderam-se investigar interacções por Espectroscopia Ultra-Violeta/Visível (entre a hemoglobina e o ALF 186) e por Espectroscopia de Infravermelhos (entre a hemoglobina e o ALF 850).

A inclusão da albumina teve como objectivo primordial a obtenção de cristais da proteína para se seguirem as pesquisas sobre possíveis interacções com os compostos ALF 190, ALF 475 e ALF 486 por Cristalografia de Raios-X.

Com a transferrina visou-se primeiramente expressar o lóbulo N-terminal em *Pichia pastoris* seguida da respectiva purificação. Após os passos de expressão e de purificação, teve-se como objectivo a obtenção de cristais de proteína de modo a, posteriormente, conseguir-se seguir as interacções entre a transferrina e os compostos ALF 190, ALF 475 e ALF 486 por Cristalografia de Raios-X.

3. – Material e Métodos

3.1 – Estudos com Lisozima

3.1.1 – Reagentes e Equipamento

A lisozima de clara de ovo foi adquirida à Sigma-Aldrich enquanto que os compostos ALF 554 e ALF 850 foram fornecidos pela empresa Alfama.

Os ensaios de Espectroscopia de Infra-vermelhos foram realizados num espectrofotómetro *Spectrum 1000* da Perkin Elmer e o brometo de potássio foi adquirido à Sigma-Aldrich.

As cristalizações foram realizadas em caixas de cristalização de 24 poços da Nextal usando-se tampão acetato da Sigma-Aldrich e cloreto de sódio adquirido à Panreac (nos ensaios de gota assente, utilizaram-se micropontes *Greiner CrystalBridge* da Jena Bioscience); o glicerol empregue na solução crio-protectora foi adquirido à Sigma-Aldrich. A visualização das gotas de cristalização efectuou-se num microscópio Olympus (modelo SZH10).

3.1.2 – Métodos

○ Espectroscopia de Infra-vermelhos

Os cristais de lisozima, aos quais se adicionou ALF 850 por *soaking*, foram transferidos para uma nova lamela deixando-se à temperatura ambiente *overnight* permitindo a evaporação do solvente em excesso.

Procedeu-se posteriormente à adição da amostra dos cristais em *pellets* de brometo de potássio (KBr) e traçou-se o espectro de infra-vermelhos.

○ Cristalografia de Raios-X

Começou-se por preparar uma solução de lisozima 50 mg/ml dissolvendo-a em água destilada. Na cristalização, usou-se como solução precipitante 0.1 M de tampão acetato pH=4.5 (NaCH₃COO) e cloreto de sódio (NaCl) 2 a 10%. Efectuaram-se ensaios de gota suspensa e de gota assente sempre com 700 µl de solução precipitante no poço e gotas de 2 µl de proteína e de 2 µl de solução precipitante a uma temperatura de 20 °C.

Adicionou-se aos cristais obtidos uma solução de *Harvesting Buffer* (0.1 M de tampão acetato, pH=4.5, e 12% de cloreto de sódio) deixando-se estabilizar *overnight*.

Após este período, prepararam-se as soluções de ALF 554 e de ALF 850 com uma concentração de *ca* 90 mM através da dissolução dos compostos na solução de *Harvesting Buffer*. Realizou-se o *soaking*, adicionando 2 µl de cada composto às gotas de interesse de modo a obter uma concentração final do composto de 30 mM.

Prolongou-se o *soaking* por 24 horas ao fim das quais se procedeu à transferência dos melhores cristais para uma solução crio-protectora (0.1 M de tampão acetato, pH=4.5, 12% de cloreto de sódio e 30% de glicerol) e ao seu congelamento em azoto líquido.

Os cristais congelados foram então analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas ID 14-4 do ESRF (Grenoble, França) e Proxima I do Soleil (Paris, França).

Para o cristal com o composto ALF 850, os dados de difracção foram indexados no programa Mosflm e processados com os programas *Pointless* e *Scala* presentes no conjunto de programas CCP4. A Substituição Molecular foi conseguida com o recurso ao programa *Phaser*, na melhoria das fases empregou-se o programa DM e para o refinamento recorreu-se ao programa *Refmac5* (todas presentes no CCP4). As visualizações moleculares foram efectuadas no programa Coot e, por último, as figuras foram geradas no programa Pymol. Cada um destes passos encontra-se descrito com maior detalhe no sub-capítulo 4.1.2.

3.2 – Estudos com Hemoglobina

3.2.1 – Reagentes e Equipamento

A hemoglobina usada nos ensaios de Espectroscopia de Ultra-violeta/Visível e de Espectroscopia de Infra-vermelhos foi adquirida à Sigma-Aldrich enquanto que a hemoglobina destinada aos ensaios de cristalização foi obtida a partir de sangue de bovino. Todos os compostos empregues (ALFs) foram fornecidos pela empresa Alfama.

Os ensaios de Espectroscopia Ultra-violeta/Visível foram realizados num espectrofotómetro *Ultrospec 2100 pro* da Amersham Biosciences.

Os ensaios de Espectroscopia de Infra-vermelhos foram realizados num espectrofotómetro *Spectrum 1000* da Perkin Elmer e as amostras em solução foram liofilizadas numa centrífuga de vácuo *Univapo 100M* da Biogen; o Tris usado aquando da diálise e o brometo de potássio empregue nos *pellets* foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

As cristalizações foram realizadas em caixas de cristalização de 24 poços da Nextal usando-se polietilenoglicol (PEG) 4K, cloreto de amónio (NH₄Cl) e iodeto de amónio (NH₄I) adquiridos, respectivamente, à Sigma-Aldrich, à Riedel de Haen e à Merck; a paratona empregue na solução crio-protectora foi adquirida à Hampton Research. A visualização das gotas de cristalização efectuou-se num microscópio Olympus (modelo SZH10).

3.2.2 – Métodos

○ Espectroscopia Ultra-violeta/Visível

Prepararam-se três soluções de hemoglobina comercial dissolvendo 5 mg da proteína em 200 µl de água destilada seguindo-se a preparação das soluções de ALF 186 e de ALF 850 (dissolução de 1 mg em 100 µl de água destilada).

Adicionaram-se 2 µl de cada um dos compostos a duas soluções de hemoglobina, agitando e deixando-se a incubar durante 2 horas ao fim das quais se traçaram os espectros UV/vis da hemoglobina nativa, da hemoglobina com o ALF 186 e da hemoglobina com o ALF 850 (diluição de 100X) com o recurso ao programa SWIFT II do espectrofotómetro.

○ Espectroscopia de Infra-vermelhos

Para a elaboração dos espectros de infra-vermelhos dos cristais de hemoglobina com o ALF 850, seguiu-se um procedimento semelhante ao descrito para a lisozima.

Já para a elaboração dos espectros de infra-vermelhos das amostras em solução, começou-se por preparar uma solução de hemoglobina comercial dissolvendo 5 mg da proteína em 180 µl de tampão 10 mM Tris-HCl (pH=8). Paralelamente, preparou-se uma solução de ALF 850 (dissolução de 1 mg em 100 µl de água destilada).

Adicionaram-se 20 µl do composto à solução de hemoglobina (levando ao vórtex para tornar homogéneo). Transferiu-se a solução de hemoglobina com ALF 850 para um botão de diálise colocando-se a dialisar em 250 ml de tampão 20 mM Tris-HCl (pH=7.8) *overnight* (a 4 °C e renovando uma vez a solução de diálise).

Após a diálise, transferiu-se a amostra para um novo tubo e procedeu-se à sua liofilização na centrifuga de vácuo. Por último, procedeu-se à adição da amostra liofilizada em *pellets* de KBr traçando-se o respectivo espectro de infra-vermelhos.

○ Cristalografia de Raios-X

Começou-se por diluir as amostras de hemoglobina em tampão Tris-HCl 20 mM (pH=8.2) para uma concentração de 60 mg/ml.

Na cristalização, empregaram-se dois métodos distintos (ambos a 20 °C). Por um lado, efectuaram-se ensaios de gota suspensa variando a solução precipitante e a proporção das gotas de acordo com o indicado na Tabela 3.1. Por outro lado, realizaram-se ensaios em que se colocou nos poços 500 µl e 700 µl de solução precipitante (20% de PEG 4K e 0.2 M de NH₄I) aos quais se adicionou directamente 3,4,5 e 6 µl de hemoglobina; repetiu-se o procedimento para a solução precipitante composta por 20% de PEG 4K e 0.2 M de NH₄Cl.

Tabela 3.1 – Condições de cristalização testadas para a hemoglobina através da técnica de gota suspensa

Todos os ensaios foram realizados com hemoglobina a 60 mg/ml e usando 700 µl de solução precipitante nos poços

Proteína	Solução precipitante no reservatório	Solução precipitante na gota	Tipo de gota (Proteína+Solução precipitante) (µl)
Hemoglobina 60 mg/ml		20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	2+2
	20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	15% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	2+2
	20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	15% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	2+3
	20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	10% de PEG 4K 0.2 M de NH_4I	2+2
		20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	2+2
		15% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	2+2
		10% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	2+2
	20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	15% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	2+2
	20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	15% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	2+3
	20% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	10% de PEG 4K 0.2 M de NH_4Cl	2+2

Para os cristais de hemoglobina obtidos pela técnica de gota suspensa, prepararam-se soluções de diversos ALFs (186, 475, 486, 487, 554, 794 e 850) com uma concentração de 90 mM através da dissolução em 25% de PEG 4K e 20 mM Tris-HCl (pH=7.5). Realizou-se o *soaking*, adicionando 0.5 µl de cada composto às gotas de interesse de modo a obter uma concentração final do composto de 10 mM. Já para os cristais de hemoglobina obtidos pela adição directa da proteína ao poço, o *soaking* foi realizado pela adição completa do conteúdo dos *vials* dos compostos (em pó) ao poço.

Em ambos os casos, prolongou-se o *soaking* por 24 horas ao fim das quais se procedeu à transferência dos melhores cristais para uma solução crio-protectora (paratona) e ao seu congelamento em azoto líquido.

Os cristais congelados foram então analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas ID 14-1 e ID 23-1 do ESRF (Grenoble, França) e Proxima I do Soleil (Paris, França).

Para o cristal com o composto ALF 850, empregaram-se os programas descritos para a lisozima.

3.3 – Estudos com Albumina

3.3.1 – Reagentes e Equipamento

A albumina (*Recombunin*) foi adquirida à Novozymes enquanto que os compostos ALF 190, ALF 475 e ALF 486 foram fornecidos pela empresa Alfama.

Os primeiros ensaios de cristalização foram realizados em caixas de cristalização de 24 poços da Nextal usando-se PEG 4K e tampão fosfato adquiridos à Sigma-Aldrich. Numa segunda fase, os ensaios foram realizados em caixas de cristalização de 96 poços da Douglas Instruments recorrendo-se ao robô de cristalização *Oryx 8* da Douglas Instruments e empregando diferentes *screens* de cristalização: JBS1, JBS2, JBS3, JBS4 e JCSG+ da Jena BioScience e PEG/Ion 4K e PEG/Ion 8K da Hampton Research; o glicerol empregue na solução crio-protectora foi adquirido à Sigma-Aldrich. A visualização das gotas de cristalização efectuou-se num microscópio Olympus (modelo SZ60).

3.3.2 – Métodos

Realizaram-se ensaios de cristalização com um *screen* de 22 a 30% de PEG 4K e 50 mM de tampão fosfato de potássio; com a proteína a 100 mg/ml, efectuaram-se ensaios de gota assente sempre com 700 µl de solução precipitante no poço e gotas de 2 µl de proteína e de 2 µl de solução precipitante a 4 °C e a 20 °C.

Paralelamente, procedeu-se à realização de ensaios no robô de cristalização (temperatura de 4 °C): variando a concentração de proteína (100 mg/ml e 150 mg/ml), usaram-se os *screens* comerciais JBS1, JBS2, JBS3, JBS4 e JCSG+ (cuja constituição se indica nos Anexos) em gotas de 0.3 µl de proteína e 0.2 µl de solução precipitante.

Os melhores cristais obtidos foram usados para *seeding* empregue em novos ensaios no robô de cristalização (gotas com 0.3 µl de proteína, 0.15 µl de solução precipitante e 0.05 µl de *seeds*), reproduzindo as condições anteriores de concentração e de temperatura, mas usando os *screens* comerciais PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K e JBS3 (constituição igualmente nos Anexos).

As condições que originaram cristais foram usadas em ensaios de co-cristalização no robô de cristalização (temperatura de 4 °C) usando albumina (150 mg/ml) incubada com ALF 190, ALF 475 e ALF 486 (adição de 1 mg do composto a 100 µl de albumina).

Após 48 horas, procedeu-se à transferência do cristal obtido com ALF 475 para uma solução crio-protectora (20% de PEG 4K, 0.2 M de tartarato de amónio e 25% de glicerol) e ao seu congelamento em azoto líquido. O cristal congelado foi posteriormente analisado por radiação de Sincrotrão na linha ID 14-4 do ESRF (Grenoble, França).

3.4 – Estudos com Transferrina

3.4.1 – Reagentes e Equipamento

A sobre-expressão do lóbulo N-terminal da transferrina do soro humano foi conseguida com recurso a glicerol (adquirido à Sigma-Aldrich) e a metanol (adquirido à Panreac). Empregaram-se ainda diferentes meios: MM, BMGY, Basal Salt e PTM-1 (ver Anexos). O crescimento da levedura ocorreu numa incubadora com agitação Weiss Gallenkamp enquanto que para as centrifugações de recolha da proteína se recorreu à ultra-centrífuga Avanti J-26 XPI da Beckman Coulter, ao rotor de centrífuga JA-10 da Beckman Coulter e a tubos de centrífuga de 500 ml da Nalgene.

Na purificação por filtração, o *Vivacell 250* e a respectiva membrana de 10 kDa foram adquiridos à Sartorius Stedim Biotec enquanto que na purificação por precipitação com sulfato de amónio, este foi adquirido à Sigma-Aldrich.

Para a cromatografia de troca iónica, usou-se uma coluna Mono Q 5/50 GL da Amersham Bioscience.

A concentração da proteína foi conseguida através do uso de *centricons* com uma membrana de 10 kDa adquiridos à Amicon e confirmada num espectrofotómetro *Ultrospec 2100 pro* da Amersham Biosciences. Efectuaram-se as centrifugações numa centrífuga 5804R da Eppendorf.

Os passos de sobre-expressão e de purificação foram seguidos através de electroforese SDS-PAGE usando uma tina de electroforese BioRad (Mini-PROTEAN® Tetra Cell) e uma fonte de alimentação igualmente da BioRad. Como marcador de pesos moleculares usaram-se NZYColour Protein Marker e NZYColour Protein Marker II ambos adquiridos à NZYTech.

Os compostos ALF 190, ALF 475 e ALF 486 foram fornecidos pela empresa Alfama.

Os primeiros ensaios de cristalização foram realizados em caixas de cristalização de 24 poços da Nextal usando-se as soluções 80! (em *stock*). Numa segunda fase, os ensaios foram realizados em caixas de cristalização de 96 poços da Douglas Instruments recorrendo-se ao robô de cristalização *Oryx 8* da Douglas Instruments e empregando diferentes *screens* de cristalização: JBS3 da Jena BioScience e PEG/Ion 4K e PEG/Ion 8K da Hampton Research; a paratona empregue na solução crio-protectora foi adquirida à Hampton Research. A visualização das gotas de cristalização efectuou-se num microscópio Olympus (modelo SZH10).

3.4.2 – Métodos

○ Sobre-expressão em *Pichia pastoris* e purificação

A sobre-expressão da proteína em *Pichia pastoris* seguiu os passos previamente estabelecidos⁶⁶. Deste modo, começou-se por plaquear o clone de interesse de *Pichia pastoris* numa placa de Petri de onde se retirou uma colónia para realizar o pré-inóculo em 10 ml de meio BMGY num tubo Falcon de 50 ml.

Após incubação *overnight* (28 °C e 240 rpm), transferiu-se o pré-inóculo para dois Erlenmeyers de 2 litros com 400 ml de meio BMGY (5 ml para cada Erlenmeyer).

Após nova incubação *overnight* (28 °C e 240 rpm), adicionaram-se 20 ml de 10% glicerol a cada Erlenmeyer deixando-se a incubar nas mesmas condições por 24 horas.

Ao fim das 24 horas, procedeu-se à centrifugação do meio de cultura (3000xg, 20 minutos, 15 °C), descartando o sobrenadante e ressuspensando o *pellet* de cada Erlenmeyer (contendo as células da levedura) em 500 ml de meio Basal Salt, 0.5 ml de meio PTM-1 e 2.5 ml de metanol. Transferiram-se as células ressuspensas para dois novos Erlenmeyers de 2 litros deixando-se a incubar nas condições descritas de modo a iniciar a primeira fase de indução.

Nos cinco dias seguintes, adicionaram-se diariamente 2 ml de metanol a cada um dos Erlenmeyers e retirou-se uma amostra de 1 ml para ser analisada por electroforese SDS-PAGE.

Após os cinco dias, procedeu-se a nova centrifugação (3000xg, 20 minutos, 15 °C). Juntou-se o sobrenadante (contendo a proteína) de ambos os Erlenmeyers a -20 °C. Ressuspendeu-se novamente o *pellet* de cada Erlenmeyer em 500 ml de meio Basal Salt, 0.5 ml de meio PTM-1 e 2.5 ml de metanol, transferindo-se para dois novos Erlenmeyers de 2 litros e deixando-se a incubar nas condições descritas de modo a iniciar a segunda fase de indução.

Nos cinco dias seguintes, adicionaram-se diariamente 2 ml de metanol a cada um dos Erlenmeyers e retirou-se uma amostra de 1 ml para ser analisada por electroforese SDS-PAGE. Após estes dias, realizou-se uma nova centrifugação (3000xg, 20 minutos, 15 °C) guardando-se o sobrenadante a -20 °C e desprezando o *pellet*.

Para a purificação da proteína, juntaram-se os sobrenadantes das duas induções e ajustou-se o pH para 7 com 10 M de hidróxido de sódio (removendo o precipitado branco formado por filtração com papel de filtro).

Na purificação por filtração com pressão, transferiu-se o sobrenadante para o *Vivacell 250* (membrana de 10 kDa) colocando-o num agitador orbital (90 rpm) e trocando o tampão para 10 mM de Tris-HCl, pH=8 (com 0.02% de azida de sódio) até um volume final de, aproximadamente, 25 ml que foi centrifugado (10000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e filtrado (papel de filtro) de forma a clarificá-lo.

Na purificação por precipitação com sulfato de amónio, começou-se por preparar uma solução sobressaturada de sulfato de amónio a 4.1 M. Usaram-se os factores presentes na Tabela 3.2 para

multiplicar o volume de sobrenadante e determinar qual o volume de sulfato de amónio a adicionar para se obter a percentagem final desejada: 20, 40, 60 e 80%. Após a adição do volume adequado de sulfato de amónio, colocou-se o sobrenadante sob agitação, a 4 °C, durante uma hora ao fim da qual se centrifugou (6000 rpm, 10 minutos, 4 °C). Ressuspendeu-se o pellet em 10 ml de tampão 10 mM de Tris-HCl, pH=8 (com 0.02% de azida de sódio). Repetiu-se este procedimento para todas as percentagens finais de sulfato de amónio partindo do sobrenadante da centrifugação anterior (por exemplo, para se obter o precipitado a 40% usou-se o sobrenadante da precipitação a 20%).

Tabela 3.2 – Factores de multiplicação usados na precipitação com sulfato de amónio

Para se conseguir a percentagem final de sulfato de amónio desejada, deve-se multiplicar o volume de sobrenadante a purificar pelo factor indicado que é influenciado pela percentagem inicial de sulfato de amónio existente em solução

Percentagem inicial de sulfato de amónio	Percentagem final de sulfato de amónio			
	20%	40%	60%	80%
0%	0.250			
20%		0.333		
40%			0.500	
60%				1

Na cromatografia de troca iónica, aplicou-se a amostra de proteína numa coluna Mono Q previamente equilibrada usando um gradiente: 10 mM de Tris-HCl, pH=8 (com 0.02% de azida de sódio) – 0.4 M de Tris-HCl, pH=8 (com 0.02% de azida de sódio).

Procedeu-se à concentração da proteína com recurso a *centricons* com membrana de 10 kDa até uma concentração de 80 mg/ml confirmando-se a concentração pela leitura da absorvância a 280 nm (numa célula de quartzo).

Os passos de indução, da purificação (*Vivacell 250* e precipitação com sulfato de amónio), da cromatografia de troca iónica e de concentração final no *centricon* foram analisados por electroforese SDS-PAGE (24mA, voltagem variável, 60 minutos).

○ Ensaio de cristalização

Realizaram-se ensaios de cristalização com as soluções 80! (condições adaptadas do método de Jancarik & Kim de 1991 e cuja composição se indica nos Anexos); com a proteína a 80 mg/ml, efectuaram-se ensaios de gota suspensa sempre com 700 µl de solução precipitante no poço e gotas de 2 µl de proteína e de 2 µl de solução precipitante a 20 °C.

Paralelamente, procedeu-se à realização de ensaios no robô de cristalização (temperatura de 20 °C): repetindo-se a concentração da proteína, usaram-se os *screens* comerciais PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K e JBS3 (constituição indicada nos Anexos) para gotas de 0.3 µl de proteína e 0.2 µl de solução precipitante.

As condições que originaram cristais foram usadas em ensaios de co-cristalização no robô de cristalização (temperatura de 20 °C) usando transferrina (80 mg/ml) incubada com ALF 190, ALF 475 e ALF 486 (adição de 1 mg do composto a 100 µl de proteína).

Após 72 horas, procedeu-se à transferência dos cristais obtidos com os três compostos para uma solução crio-protectora (paratona) e ao seu congelamento em azoto líquido. Os cristais congelados foram posteriormente analisados por radiação de Sincrotrão nas linhas ID 14-1 e ID 14-4 do ESRF (Grenoble, França).

4. – Resultados e Discussão

4.1 – Estudos com Lisozima

Antes de se tentar obter resultados relativos à interacção dos CORMs com proteínas sanguíneas (hemoglobina, albumina e transferrina), começou-se por analisar estas mesmas interacções com a lisozima de clara de ovo.

Esta escolha justifica-se com o facto da lisozima ser um excelente modelo nos estudos de Cristalografia de Raios-X, não só pela facilidade em cristalizar, mas também pela qualidade da difracção que os cristais costumam possuir. Juntando a estas características, a capacidade da lisozima conseguir estabelecer interacções com ligandos diversos, percebe-se que a caracterização do complexo lisozima-CORM pode ajudar na posterior interpretação dos dados relativos à ligação do CORM com as proteínas de interesse.

O estudo da lisozima com os CORMs foi seguido através de Espectroscopia de Infra-vermelhos e de Cristalografia de Raios-X.

4.1.1 – Espectroscopia de Infra-vermelhos

A Espectroscopia de Infra-vermelhos revela-se uma metodologia útil na caracterização das interacções entre proteínas e os MCCs ao conseguir determinar as vibrações de elongação (*stretching vibrations*) características do CO em tais compostos.

Assim, no sentido de se identificar possíveis interacções entre a lisozima e o ALF 850, utilizaram-se parte dos cristais de lisozima destinados aos estudos por Cristalografia de Raios-X (Figura 4.1) para realizar *soaking* com o composto durante 24 horas (as condições de obtenção dos cristais estão descritas no subcapítulo 4.1.2.1) e traçar o respectivo espectro de infra-vermelhos (Figura 4.2).

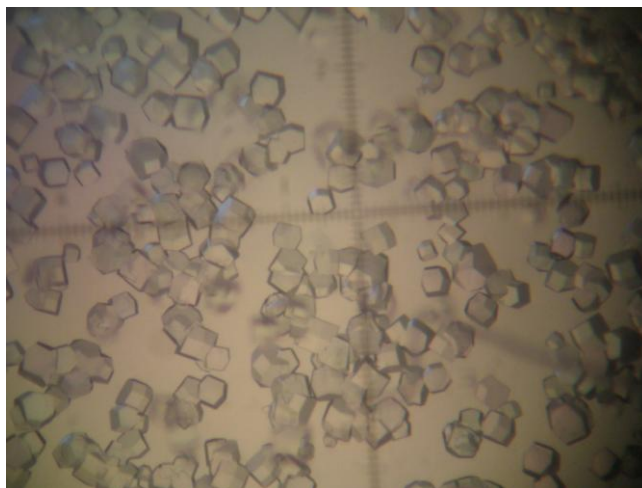


Figura 4.1 – Cristais de lisozima empregues no *soaking* com o ALF 850 para análise por Espectroscopia de Infra-vermelhos
Cristais obtidos com 0.1 M de tampão acetato (pH=4.5) e 6% de NaCl e com um tamanho compreendido entre 0.1 e 0.2 mm

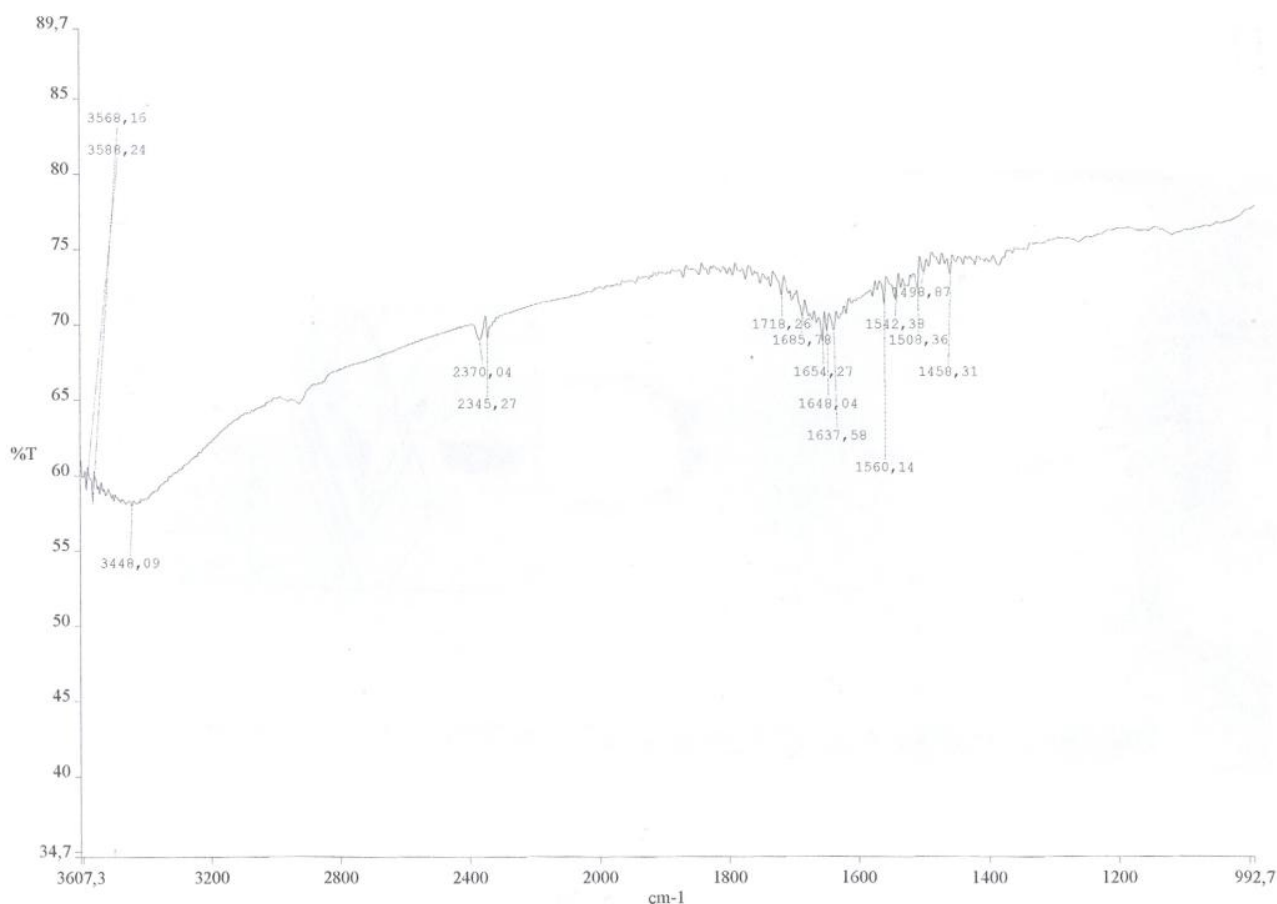


Figura 4.2 – Espectro de infra-vermelhos da amostra de cristais de lisozima com ALF 850

Não se observam bandas entre 2060 e 1950 cm^{-1} o que indica que não houve a formação de aductos entre a proteína e o composto

Após o *soaking*, procurou-se transferir o máximo de cristais possíveis da gota de cristalização para uma nova lamela sem arrastar a solução de cristalização para garantir que a eventual detecção de sinal se deve efectivamente a aductos entre a proteína e o ALF 850 e não ao composto que não reagiu e se mantém na referida solução.

Os estudos previamente realizados com lisozima e o CORM-3⁵⁰ apontam para a existência de um par de bandas situadas, aproximadamente, entre 2060 e 1950 cm^{-1} pelo que é expectável um comportamento semelhante no presente caso de estudo. Contudo, a análise do espectro de infra-vermelhos obtido, representado na Figura 4.2, contraria o esperado ao revelar a ausência de bandas nessa zona. Tal ausência aponta para o facto de não existir aductos proteína-composto levando a três interpretações: o *soaking* não ter resultado e o ALF 850 não se incorporou nos cristais de lisozima, a quantidade de cristais utilizados ter sido insuficiente para a correcta detecção do sinal do aducto ou esta ligação não se verificar naturalmente.

Os conhecimentos já adquiridos apontam para a ocorrência das ligações entre os metais de transição e certos resíduos da lisozima pelo que a terceira hipótese é pouco plausível. Juntando os resultados obtidos nos estudos por Cristalografia de Raios-X, este cenário torna-se ainda menos

provável já que os dados estruturais (conforme discutido no subcapítulo seguinte) mostram a presença de ruténio nos cristais de lisozima. Consequentemente, ter-se-á que tentar novamente o *soaking* dos cristais de lisozima com o ALF 850, aumentando o número de cristais seleccionados para análise, e repetir o espectro de infra-vermelhos de modo a corroborar os resultados evidenciados pela Cristalografia.

Assim, os resultados extraídos da espectroscopia de infra-vermelhos não tornam possível tirar conclusões acerca do estabelecimento de aductos entre a lisozima e o ALF 850. Todavia, o recurso a metodologias complementares confirmam a existência de tais aductos pelo que, com os cuidados expressos anteriormente, se espera que a repetição do espectro de infra-vermelhos permita chegar a resultados idênticos e, deste modo, contribua para a correcta caracterização das interacções entre a lisozima e o ALF 850.

4.1.2 – Cristalografia de Raios-X

Considerando os diferentes passos necessários no estudo por Cristalografia de Raios-X, torna-se mais perceptível apresentar os Resultados e respectiva Discussão em cinco secções.

4.1.2.1 – Ensaios de cristalização

Encontrando-se bem caracterizada, sabe-se que a cristalização da lisozima é conseguida usando uma concentração de proteína igual a 50 mg/ml e como solução precipitante 0.1 M de tampão acetato (pH=4.5) com diferentes percentagens de cloreto de sódio (NaCl): 2 a 10%⁵⁰.

Efectuaram-se ensaios de cristalização a 20 °C reproduzindo as condições descritas através do método de difusão de vapor: gota suspensa (*hanging drop*) e gota assente (*sitting drop*) de 2 µl + 2 µl (2 µl de proteína e 2 µl de solução precipitante). No dia seguinte à preparação das gotas, foi já possível observar a formação de cristais que se deixaram em repouso para promover o seu crescimento até valores considerados ideais para as acções subsequentes (entre 0.1 e 0.2 mm) podendo-se comprovar que os cristais de lisozima são estáveis após a sua formação.

Obtiveram-se melhores cristais (únicos com tamanho adequado e arestas bem definidas) para a condição de 6% de NaCl tanto nos ensaios de gota suspensa (Figura 4.3) como nos de gota assente (Figura 4.4) pelo que foram os escolhidos para a próxima fase do trabalho, ou seja, a realização do *soaking* dos cristais com os compostos desejados (ALF 554 e ALF 850) de modo a conseguir-se a sua incorporação nos cristais de lisozima. Para tal, adicionaram-se 4 µl de solução de estabilização (*Harvesting Buffer*) às gotas de interesse e, após deixar-se *overnight*, adicionaram-se 2 µl de ALF 554 e de ALF 850 (com uma concentração de 30 mM).

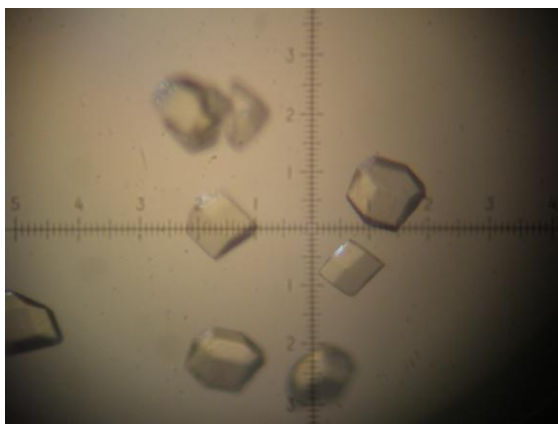


Figura 4.3 – Cristais de lisozima obtidos nos ensaios de gota suspensa
Cristais obtidos com 0.1 M de tampão acetato (pH=4.5) e 6% de NaCl e com um tamanho de, aproximadamente, 0.2 mm

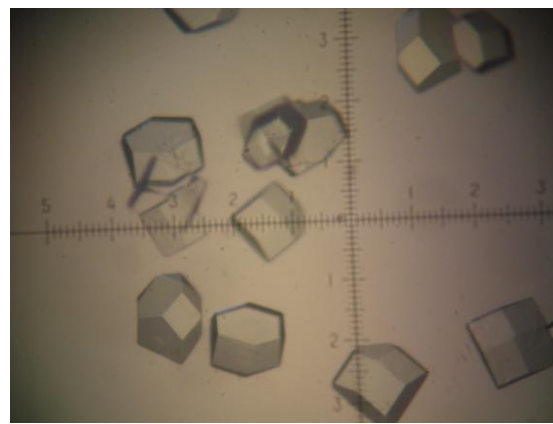


Figura 4.4 – Cristais de lisozima obtidos nos ensaios de gota assente
Cristais obtidos com 0.1 M de tampão acetato (pH=4.5) e 6% de NaCl e com um tamanho de, aproximadamente, 0.2 mm

Este passo revela-se importante para o sucesso da experiência visto que, em virtude da elevada percentagem de água, os cristais de proteínas são frágeis e a adição de *Harvesting Buffer* que tem a mesma composição da solução precipitante, mas com maior concentração do agente precipitante (neste caso, 12% de NaCl), permite que o cristal não se dissolva aquando da sua manipulação.

Por outro lado, os compostos encontram-se liofilizados pelo que é necessário dissolvê-los antes de realizar o *soaking*. Usando-se água para esta dissolução, existe o risco de, aquando da adição do composto ao cristal, se perturbar o equilíbrio existente na gota levando à diluição do cristal. Este problema foi ultrapassado pela dissolução dos compostos no próprio *Harvesting Buffer* que, estando já presente na gota, atenua a referida perturbação e contribui para a sobrevivência dos cristais.

Prolongou-se o *soaking* durante 24 horas ao fim das quais se verificaram as gotas (Figura 4.5) observando-se, no caso do ALF 554, alguns cristais com formas irregulares e com fissuras e, no caso do ALF 850, uma coloração amarelada dos cristais o que, em ambos os casos, parece indicar o sucesso do *soaking*, ou seja, a difusão do composto pelo cristal.

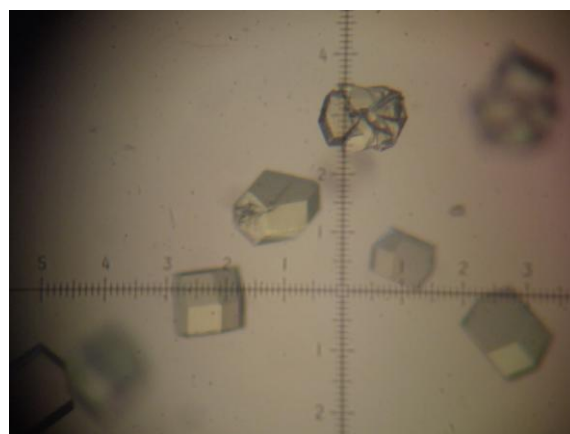


Figura 4.5 – Cristais de lisozima após o *soaking* (durante 24 horas) com o ALF 850
Observam-se cristais de, aproximadamente, 0.2 mm e com uma coloração amarela indicativo que o *soaking* funcionou

Procedeu-se então à recolha e congelamento em azoto líquido dos melhores cristais com ALF 554 e com ALF 850 para posterior análise por radiação de Sincrotrão no ESRF, sigla para *European Synchrotron Radiation Facility* (Grenoble, França), e no Soleil (Paris, França). Saliente-se a

necessidade de empregar uma solução crio-protectora aquando do congelamento (aqui conseguida pela adição de 30% de glicerol à solução de estabilização) para evitar a formação de anéis de gelo que interferem na interpretação dos resultados de difracção.

Na Tabela 4.1, encontram-se resumidas as condições observadas para os cristais analisados. Os dados relativos aos cristais de lisozima com o ALF 554 encontram-se presentemente a ser processados não sendo aqui incluídos por questões de propriedade intelectual. Já os dados relativos ao cristal de lisozima com o ALF 850 foram tratados no seguimento da presente Dissertação apresentando-se nos próximos subcapítulos seguintes os passos até à determinação e interpretação da estrutura tridimensional do complexo.

Tabela 4.1 – Resumo das condições e resultados de difracção dos cristais de lisozima analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF e Soleil)

Proteína	Soaking com	Condições de cristalização	Crio-protector	Linha de Sincrotrão	Resultado de difracção
Lisozima 50 mg/ml	ALF 554	0.1M Tampão Acetato de sódio (pH=4.5) 6% NaCl	0.1M Tampão Acetato de sódio (pH=4.5) 6% NaCl 30% Glicerol	ID 14-4 ESRF	Resolução de 1.5 Å
Lisozima 50 mg/ml	ALF 554			ID 14-4 ESRF	Resolução de 1.4 Å
Lisozima 50 mg/ml	ALF 554			ID 14-4 ESRF	Resolução de 1.3 Å
Lisozima 50 mg/ml	ALF 850			Proxima I Soleil	Resolução de 1.79 Å

4.1.2.2 – Experiência de difracção – Lisozima + ALF 850

Como referido anteriormente, o cristal de lisozima com o ALF 850 difractou até 1.79 Å (recolha de dados a um comprimento de onda de 0.99 Å). Torna-se agora necessário tratar as reflexões existentes no padrão de difracção (Figura 4.6) de modo a conseguir os índices hkl (coordenadas no espaço recíproco) com as respectivas intensidades (I_{hkl}) e o erro associado (σ_{hkl}).

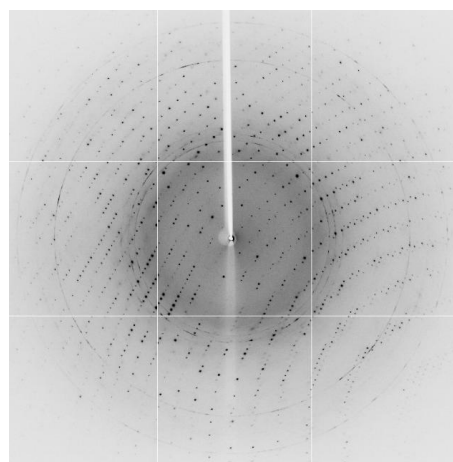


Figura 4.6 – Padrão de difracção do cristal de lisozima com o ALF 850

Para tal, recorreu-se ao programa Mosflm que, originando no final um ficheiro mtz com as informações supracitadas, permite indexar as imagens recolhidas do cristal no Sincrotrão (neste caso, 200 imagens) e obter os parâmetros que caracterizam a célula unitária (constantes a , b , c e ângulos α , β , γ). Assim, os dados obtidos permitem verificar que o cristal em estudo possui como constantes: $a=78.79$, $b=78.79$, $c=37.32$ Å e $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$.

Atendendo a que $a=b \neq c$ e que $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, pode-se desde logo comprovar que o cristal pertence ao sistema cristalino tetragonal, mas não concluir acerca do respectivo grupo espacial.

Esta determinação consegue-se através da utilização do programa *Pointless* presente no conjunto de programas cristalográfico CCP4 (sigla para *Collaborative Computational Project Number 4*). O *Pointless* analisa as intensidades das reflexões obtidas (presentes no ficheiro mtz proveniente do Mosflm) sendo capaz de fornecer o grupo espacial que melhor se adapta às constantes da célula unitária. Verifica-se que o cristal de lisozima com o composto ALF 850 pertence, com uma probabilidade de 98.6%, ao grupo espacial $P4_32_12$.

Por outro lado, neste ponto, as intensidades das reflexões medidas não se podem comparar por não se encontrarem na mesma escala (por exemplo, ao longo da recolha de dados, o feixe de raios-X pode ir danificando o cristal provocando uma variação nas intensidades obtidas). De modo a ultrapassar esta limitação e escalar os dados obtidos, recorreu-se ao programa *Scala* do CCP4; usando o ficheiro mtz originário do *Pointless*, o *Scala*, além da correcção dos dados, fornece estatísticas úteis para a avaliação da sua qualidade sumariadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews do cristal de lisozima com o ALF 850

Multiplicidade = Total de reflexões medidas / Total de reflexões únicas

$$R_{merge} = \frac{\sum |I_k| - \langle I \rangle}{\sum |I_k|} \quad VM = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}} \quad \text{Conteúdo em solvente} = 1 - (1.23/V_M)$$

Parâmetro	Resultados globais	Camada externa de resolução
Resolução	39.39 - 1.79 Å	1.89 - 1.79 Å
$\langle I/\sigma I \rangle$	30.9	17.7
Multiplicidade	14.3	14.4
Número de Reflexões totais	144756	23188
Número de Reflexões únicas	10106	1615
R_{merge}	6.4%	12.1%
Mosaicidade	0.51	
Completeness	87.30%	98.10%
Número de moléculas por unidade assimétrica	1	
Coeficiente de Matthews (V_M)	2.01 Å/Dalton	
Conteúdo em solvente	38.88%	

A análise dos dados fornecidos permite, numa primeira instância, verificar que os dados podem ser usados com confiança já que a intensidade é, aproximadamente, 31 vezes maior que o ruído associado ($\langle I/\sigma I \rangle$ de 30.9). De notar que mesmo na camada mais externa de resolução (1.89 a 1.79 Å), este valor é bem maior que o mínimo teórico (17.7 e 2, respectivamente) o que significa que os dados a altas resoluções continuam a ser válidos podendo ser, efectivamente, usados e auxiliando na construção de um modelo mais completo.

Seguidamente, a multiplicidade expressa quantas vezes uma dada reflexão foi medida o que se consegue sabendo o total de reflexões existente no conjunto de dados e o número de reflexões únicas, isto é, não relacionadas entre si por simetria. Uma alta multiplicidade permite um melhor cálculo das intensidades e respectivo erro associado o que no cristal em estudo se verifica (multiplicidade de 14.3).

Por outro lado, o valor de R_{merge} estabelece a relação entre as reflexões equivalentes que devem possuir uma intensidade semelhante. O seu valor não deve ser alto caso contrário os dados recolhidos não serão úteis para a resolução da estrutura; idealmente o valor de R_{merge} deve situar-se entre os 5% e os 10% (tal como se verifica no cristal de lisozima com ALF 850 com um valor de R_{merge} de 6.4%) sendo que na camada mais externa de resolução esse valor aumenta (correspondendo igualmente ao caso em estudo com 12.1%).

Já a mosaicidade ilustra o nível de organização interna do cristal ao representar o desfasamento da célula unitária no espaço tridimensional. Uma baixa mosaicidade (teoricamente menor que 1) revela que o desfasamento não é significativo pelo que a organização do cristal é elevada e os dados de difracção são bons o suficiente para a resolução da estrutura. Neste caso, a mosaicidade obtida de 0.51 indica que os dados recolhidos se adequam para a continuação do trabalho.

Por último, o valor de *completeness* traduz a percentagem de reflexões medidas face ao número total de reflexões possíveis a dada resolução devendo ser o mais próximo possível de 100%. Os dados em estudo apresentam um valor de *completeness* de 87.3% o que, mesmo ainda um pouco afastado da totalidade, pode ser suficiente para a resolução da estrutura: existem estruturas resolvidas com sucesso e que possuem valores de *completeness* inferiores.

Em conclusão, a análise da generalidade dos parâmetros atrás discutidos aponta para a qualidade dos dados de difracção pelo que é possível avançar para a resolução do modelo.

4.1.2.3 – Resolução da estrutura – Lisozima + ALF 850

O tratamento dos dados efectuado até agora possibilitou a determinação das intensidades das reflexões sendo que a intensidade corresponde, aproximadamente, ao quadrado dos Factores de estrutura (F_{hkl}). Contudo, este mesmo tratamento não torna possível estabelecer o ângulo da fase das ondas difractadas (α_{hkl}) o que leva ao chamado Problema da Fase.

Assim, a resolução da estrutura requer a solução prévia do problema da fase. No caso da lisozima com o ALF 850, atendendo ao facto da estrutura da lisozima estar identificada há largos anos, escolheu-se o Método de Substituição Molecular (*Molecular Replacement*) para determinar as fases através do programa *Phaser* do CCP4.

A primeira etapa da Substituição Molecular passa pela escolha da estrutura conhecida usada para a determinação das fases do complexo em causa através da consulta da base de dados PDB (*Protein Data Bank*). A realização desta escolha baseou-se em critérios que assegurem que a estrutura conhecida seja a mais aproximada possível à estrutura em estudo: proveniente do mesmo organismo (neste caso, galinha de nome científico *Gallus gallus*), não possuir grande número de ligandos (para a estrutura se manter inalterada) e pertencer ao mesmo grupo espacial. Acrescente-se a esta lista o facto de uma resolução alta facilitar o futuro refinamento e interpretação da estrutura. Seguindo todas as indicações referidas, concluiu-se que a estrutura de lisozima com o código 193L (Figura 4.7) seria a mais adequada para a Substituição Molecular⁶⁷.

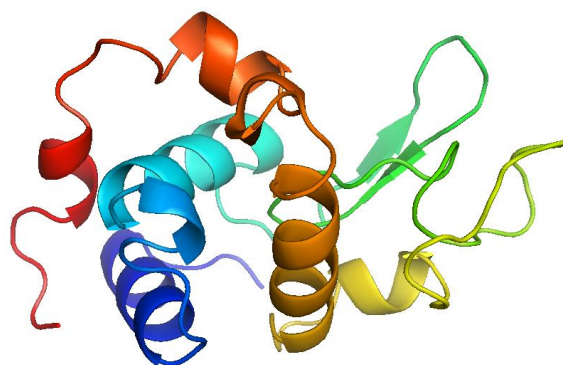


Figura 4.7 – Estrutura da lisozima correspondente à entrada 193L do PDB

A imagem foi gerada no programa Pymol. A coloração da imagem acompanha a progressão do N-terminal (azul) até ao C-terminal (vermelho)

Após a escolha da estrutura semelhante à estrutura em estudo e o número de moléculas na unidade assimétrica (Tabela 4.2), é possível então utilizar o *Phaser* para a Substituição Molecular. Os dados provenientes do *Scala* e da estrutura 193L permitem ao *Phaser*, através de mecanismos de rotação e de translação, resolver as fases e, consequentemente, a estrutura. Durante a rotação, consegue-se encontrar a orientação da estrutura de interesse na unidade assimétrica enquanto que na translação se assiste ao posicionamento da estrutura de interesse na unidade assimétrica.

De modo a avaliar os resultados gerados pelo *Phaser*, atentou-se nas estatísticas geradas na rotação e na translação: *Log Likelihood Gain* (de sigla LLG) e *Z-score*.

Como o LLG quantifica o número de vezes que a solução encontrada é melhor que uma solução aleatória, quanto maior o valor de LLG, melhor é a solução; valores próximos de 100 para a rotação e de 1000 para a translação indicam resultados positivos.

Já o *Z-score* funciona como o valor de desvio-padrão da solução face à média. Valores de *Z-score* inferiores a 4 indicam a aleatoriedade da solução enquanto que valores superiores a 8 confirmam a resolução da estrutura devendo ser maiores na translação quando comparados com a rotação.

A análise dos resultados, tanto da rotação (LLG de 88.86 e *Z-score* de 13.12) como da translação (LLG de 760.79 e *Z-score* de 28.60), permite afirmar que se obteve uma boa solução. Deste modo, todos os pressupostos da qualidade das fases calculadas se verificam no caso em estudo pelo que se resolveu com sucesso a estrutura do complexo proteína-composto obtendo-se um ficheiro mtz com os factores de estrutura e as fases (que permitem calcular mapas de densidade electrónica) e um ficheiro PDB com as coordenadas atómicas do modelo.

Por outro lado, ao conseguir-se determinar correctamente as fases, é possível melhorá-las de modo a obter igualmente um melhor modelo. O melhoramento das fases conseguiu-se graças ao recurso ao programa *Density Modification* (de sigla DM) do CCP4 capaz de, com as informações do mtz proveniente do *Phaser* e da indicação da percentagem de solvente (Tabela 4.2), diminuir o ruído associado às regiões com solvente (mais desordenadas) e destacar as regiões ocupadas pela proteína. Como tal, gera-se um novo ficheiro mtz com as fases melhoradas que se revela extremamente útil nos passos de refinamento posteriores.

Em conclusão, a utilização dos programas *Phaser* e DM permitiu a determinação (e posterior melhoramento) das fases pelo que se conseguiu resolver a estrutura do complexo de lisozima com ALF 850 e obter as informações necessárias para o seu refinamento.

4.1.2.4 – Refinamento da estrutura – Lisozima + ALF 850

No seguimento da obtenção da densidade electrónica e do modelo, é necessário proceder ao refinamento da estrutura, isto é, ir minimizando as diferenças entre os Factores de estrutura observados (F_{obs} ou F_o) e os Factores de estrutura calculados (F_{calc} ou F_c) ou, noutras palavras, ajustar o modelo à densidade electrónica.

Numa primeira abordagem, o refinamento foi conseguido com o programa *Refmac5* do CCP4. Após a introdução do ficheiro mtz elaborado pelo DM e do ficheiro PDB do *Phaser*, o *Refmac5* procedeu a 10 ciclos de refinamento originando dois novos ficheiros mtz e PDB e fornecendo estatísticas sobre o refinamento (Tabela 4.3).

Conforme discutido posteriormente, os valores presentes na Tabela 4.3 indicam que o modelo ainda não explica totalmente os dados experimentais. Assim sendo, o próximo passo consiste na utilização do programa gráfico Coot (*Crystallographic Object-Oriented Toolkit*) que permite a manipulação do modelo no sentido de se ajustar à densidade electrónica (correspondentes, respectivamente, aos ficheiros PDB e mtz provenientes do *Refmac5*).

Tabela 4.3 – Estatísticas do refinamento inicial e final da estrutura de lisozima com o ALF 850

Parâmetro	Refinamento inicial	Refinamento final
Factor R	0.2192	0.1720
R_{free}	0.2747	0.2571
RMSD para o comprimento de ligação	0.0308 Å	0.0198 Å
RMSD para o ângulo de ligação	2.3122°	1.8244°

De notar ainda que o ficheiro mtz possibilita a visualização de dois tipos de densidade electrónica no Coot: $2F_o - F_c$ e $F_o - F_c$. O primeiro atribui maior peso aos factores observados permitindo obter o contorno a 1σ (sigma) da densidade electrónica e que permite o ajuste do modelo aos dados experimentais. O segundo elucida acerca dos erros do modelo: uma densidade positiva (F_o maior que F_c e normalmente colorida a verde) indica que existem electrões em falta no modelo face aos dados experimentais (ou seja, é necessário introduzir átomos nessa zona) enquanto que uma densidade negativa (F_o menor que F_c e normalmente colorida a vermelho) indica que o modelo possui átomos não explicados pelos dados experimentais (devendo ser retirados do modelo ou ajustando o factor de ocupação).

Por outro lado, um dos principais objectivos do refinamento consiste em verificar se o ALF 850 se ligou à lisozima e, só no caso desta ligação ocorrer, proceder à determinação da posição correcta dos átomos envolvidos na mesma. Como tal, decidiu-se começar por procurar moléculas de ALF 850 na estrutura.

A referida verificação foi facilitada pela criação de um mapa anómalo. O ALF 850 possui ruténio na sua composição que, sendo um metal de transição, consegue absorver os raios-X e difractá-los de forma diferente quando comparado com o hidrogénio, o oxigénio e o carbono auxiliando na sua identificação. Para tal, recorreu-se novamente ao *Scala* (agora activando a opção de difracção anómala), ao programa CAD do CCP4 (que juntou os dados anómalos do *Scala* com os presentes no mtz do *Refmac5*) e ao programa FFT do CCP4 (geração do mapa anómalo).

Após a obtenção de todos estes ficheiros, empregou-se o Coot para os visualizar – modelo, densidade electrónica ($2F_o - F_c$ e $F_o - F_c$) e mapa anómalo – e proceder à localização dos átomos de ruténio do ALF 850. Tendo presente as informações atrás discutidas, conclui-se que, com elevado grau de probabilidade, os átomos de ruténio possuem densidade $2F_o - F_c$, densidade $F_o - F_c$ positiva e densidade anómala. Quando estes requisitos se verificam, significa que existe algo a acrescentar no modelo que não corresponde aos usuais átomos presentes nos aminoácidos (carbono, hidrogénio, oxigénio e enxofre) o que, no caso em estudo, corresponde ao ruténio já que não existiam outros compostos com átomos pesados no meio de cristalização aquando do *soaking* da lisozima com o ALF 850.

Verificou-se a existência de quatro prováveis localizações para átomos de ruténio (discutidas posteriormente no sub-capítulo da caracterização da estrutura) pelo que se pode concluir que o *soaking* resultou e o ALF 850 incorporou-se no cristal.

Sabendo-se que a estrutura inclui ruténio, continuou-se o refinamento procurando-se encaixar os resíduos da lisozima na densidade electrónica, verificando-se as moléculas de água e, por último, modelando os átomos de ruténio com a adição de ligandos tendo em conta os factores de ocupação e os factores de temperatura (a interpretação da modelação dos átomos de ruténio será igualmente retomada no próximo sub-capítulo). Após cada conjunto de alterações efectuadas no Coot, recorreu-se ao *Refmac5* para refinar a estrutura e ser possível avaliá-las.

Efectuaram-se 24 ciclos de refinamento (alterações no Coot e utilização do *Refmac5*) ao fim dos quais se concluiu que o modelo construído explica satisfatoriamente os dados experimentais através da verificação das estatísticas de refinamento finais indicadas na Tabela 4.3.

Analisando o factor R, é possível observar a sua diminuição gradual ao longo do refinamento passando do valor inicial de 0.2192 para o final de 0.1720 o que mostra a correcta construção do modelo (factor R inferior a 0.20).

Já em relação ao R_{free} , cujo cálculo se efectuou recorrendo a 5% das reflexões, passou-se de um valor inicial de 0.2747 para um valor final de 0.2571 acompanhando a descida do factor R. Embora se verifique que a diferença entre os valores finais do factor R e do R_{free} (0.1715 e 0.2571, respectivamente) seja um pouco superior a 0.05, a inspecção manual da estrutura e o recurso a outros parâmetros de validação não indicam erros significativos no modelo sendo expectável a sua correcta construção.

Por outro lado, a validação da estrutura é igualmente conseguida pela análise da estereoquímica do modelo dada pelo RMSD (sigla para Raiz Quadrada da Variância ou Desvio Padrão do inglês *Root Mean Square Deviation*). Os valores de RMSD quantificam o desvio do modelo em relação a valores teóricos estabelecidos destacando-se o comprimento de ligação e o ângulo de ligação: o primeiro deve ser aproximadamente 0.02 Å enquanto que o segundo deve ser menor que 3°. Comparando os valores de RMSD teóricos com os obtidos no refinamento, constata-se que os últimos se enquadram no esperado: 0.0198 Å para o comprimento de ligação e 1.8244° para o ângulo de ligação. Acresce ainda o facto de terem diminuído ao longo do refinamento (valores iniciais de, respectivamente, 0.0308 Å e 2.3122°) o que indica fortemente que a geometria do modelo foi progressivamente melhorando ao longo do refinamento.

Em conclusão, avaliando as estatísticas resultantes do refinamento da estrutura de lisozima com o ALF 850, pode-se afirmar que o modelo construído corresponde à realidade explicando os dados experimentais e permitindo proceder à caracterização da estrutura.

4.1.2.5 – Caracterização da estrutura – Lisozima + ALF 850

Começa-se por esclarecer que as figuras apresentadas no presente sub-capítulo foram geradas através da utilização do programa de visualização estrutural Pymol.

Assim, o uso do Pymol permitiu, numa primeira instância, confirmar a estrutura secundária da lisozima descrita na literatura com a existência de sete hélices α e de duas folhas β .

Por outro lado, conforme referido aquando do refinamento, seguindo os pressupostos supracitados, foram encontrados quatro locais de ligação do ALF 850 à lisozima sendo possível identificar junto a que resíduos da proteína se encontram (como ilustrado na Figura 4.8): Histidina 15, Aspartato 18, Aspartato 101 e Aspartato 119. Por uma questão logística, os átomos de ruténio serão designados por Ru1, Ru2, Ru3 e Ru4 de acordo com a ordem dos resíduos aos quais se encontram associados.

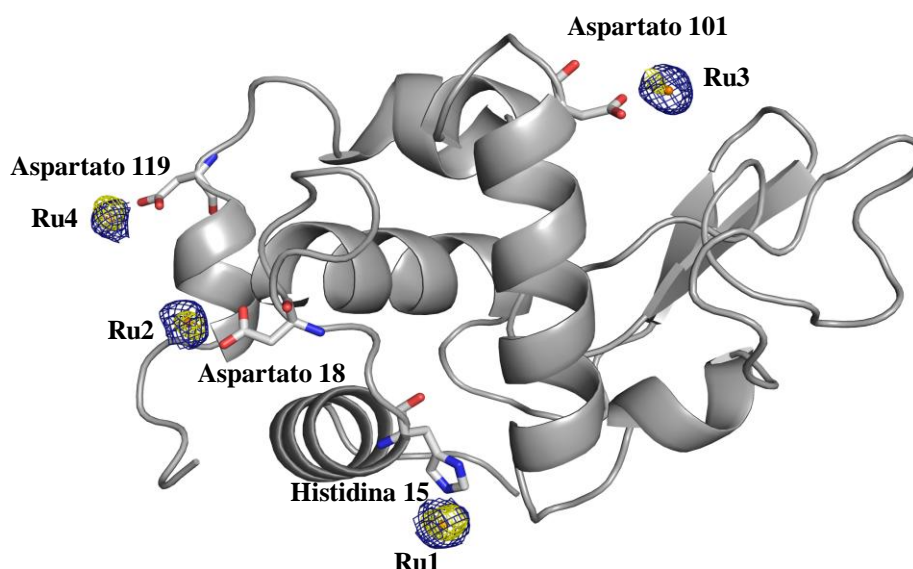


Figura 4.8 – Localização dos átomos de ruténio do ALF 850 na estrutura da lisozima

Observa-se a existência de quatro átomos de ruténio na estrutura junto à Histidina 15 e a três resíduos de Aspartato (18, 101 e 119)

A imagem foi preparada no programa Pymol. O mapa de densidade $2F_o - F_c$ (a azul) possui um contorno de 1σ enquanto que o mapa de densidade anómala (a amarelo) possui um contorno de 3σ . Os átomos de ruténio encontram-se coloridos a laranja

Deste modo, tendo-se determinado a presença de ruténio, foi necessário modelar cada um dos átomos tendo em atenção o factor de ocupação e o factor de temperatura (também designado por factor B). Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Factores de ocupação e factores B dos átomos de ruténio do ALF 850 presentes na estrutura da lisozima

Átomo de ruténio	Resíduo da lisozima associado	Factor de ocupação	Factor B (em Å ²)	Factor B para a totalidade dos aminoácidos (em Å ²)	Factor B para a totalidade das águas (em Å ²)
Ru1	Histidina15	0.55	35.93	16.78	22.64
Ru2	Aspartato 18	0.35	33.41		
Ru3	Aspartato 101	0.3	37.03		
Ru4	Aspartato 119	0.3	29.54		

Pela análise dos dados da tabela anterior, verifica-se que nenhum dos átomos de ruténio apresenta um factor de ocupação igual a 1, ou seja, os átomos não se encontram sempre na posição indicada pelo modelo em todas as moléculas do cristal.

O factor B traduz a vibração de dado átomo em relação à sua posição possibilitando, por um lado, a determinação da mobilidade relativa dos átomos do modelo e, por outro lado, a detecção de erros no modelo; se dado átomo possuir uma ocupação incorrecta ou estiver numa posição indevida, o seu factor de temperatura irá ser mais elevado que os dos átomos próximos. Consequentemente, de modo a alcançar os factores B constantes da Tabela 4.4 (relativamente semelhantes aos verificados nos átomos dos resíduos de lisozima adjacentes), foi necessário recorrer à diminuição progressiva do factor de ocupação até aos valores apresentados.

A baixa ocupação verificada no Ru2, no Ru3 e no Ru4 faz com que se torne complicado explicar correctamente a densidade electrónica à volta destes átomos não permitindo prosseguir a sua modelação o que, possivelmente, pode contribuir para o valor relativamente elevado de R_{free} discutido anteriormente.

Por seu turno, a ocupação do Ru1 (0.55) revela-se suficientemente satisfatória para se conseguir uma interpretação preliminar da densidade electrónica e continuar a modelação de modo a identificar quais as moléculas que estabelecem interações com o ruténio, nomeadamente o CO.

Na Figura 4.9, representa-se a modelação preliminar efectuada para o Ru1 podendo-se, numa primeira análise, constatar que os átomos inseridos se encaixam na densidade electrónica observada. Embora a densidade electrónica não permita ainda concluir acerca de todos os ligandos do Ru1, é visível que este estabelece interações com um dos átomos de azoto (Nε2) da cadeia lateral da Histidina 15 e com uma molécula de CO. Adicionaram-se ainda três moléculas de água (H₂O 143, H₂O 180 e H₂O 198) e, de modo provisório, seleccionou-se um dos átomos de azoto (Nη2) da cadeia lateral da Arginina 14 como sexto ligando de modo a verificar-se uma geometria octaédrica característica do ruténio.

Foi ainda possível determinar as distâncias entre o átomo de ruténio e os vários ligandos (Tabela 4.5) verificando-se que se encontram dentro dos valores expectáveis para a ocorrência de

ligação pesquisados na base de dados *Cambridge Structural Database* (de sigla CSD) e observados no CORM-3⁵⁰.

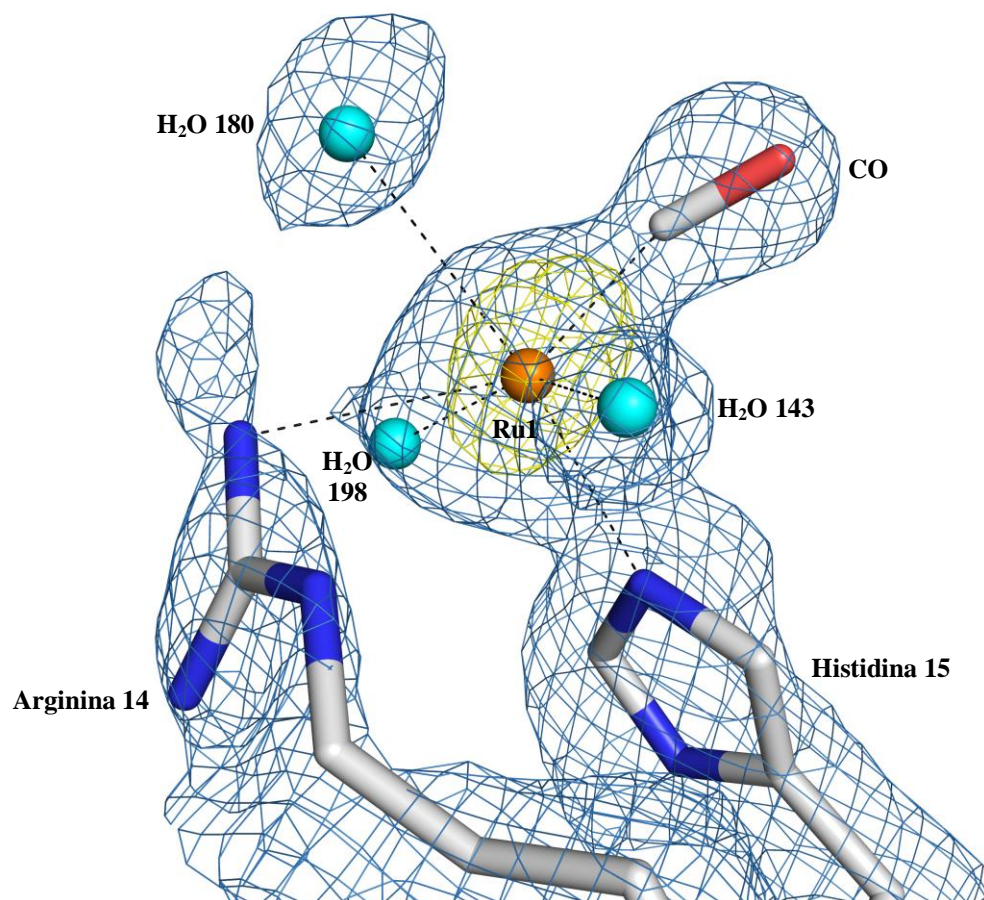


Figura 4.9 – Caracterização estrutural preliminar do aduto estabelecido entre o Rutênio 1 do ALF 850 e a lisozima

O rutênio apresenta uma geometria octaédrica possuindo 6 ligandos: um átomo de azoto da Histidina 15, um átomo de azoto da Arginina 14, uma molécula de CO e três moléculas de água (H₂O 143, H₂O 180 e H₂O 198)

A imagem foi preparada no programa Pymol. O mapa de densidade 2F_o-F_c (a azul) possui um contorno de 1σ enquanto que o mapa de densidade anômala (a amarelo) possui um contorno de 3σ. O átomo de rutênio encontra-se colorido a laranja e as moléculas de água encontram-se coloridas a azul claro

Tabela 4.5 – Distâncias inter-atômicas entre o Rutênio 1 do ALF 850 e os respectivos ligandos

Ligando do átomo de rutênio 1	Distância (em Å)
Nε2 da Histidina 15	2.41
Nη2 da Arginina 14	2.68
Carbono do CO	2.08
H ₂ O 143	2.34
H ₂ O 180	2.71
H ₂ O 198	2.08

Embora não seja possível divulgar a estrutura do ALF 850 por motivos de propriedade intelectual, pode-se adiantar que o mesmo possui três moléculas de CO das quais apenas uma se manteve no aducto formado com a lisozima (os restantes ligandos originais presentes no ALF 850 foram também perdidos na reacção com a proteína).

De facto, a análise da densidade electrónica revela unicamente a presença de uma molécula de CO o que pode ter duas explicações alternativas: ou a reacção entre a proteína e o ALF 850 terá levado à libertação das restantes duas moléculas de CO pelo composto aquando do *soaking* (24 horas) ou, encontrando-se no aducto, estão de tal forma desordenadas (ocupação muito baixa) que impossibilitam a sua correcta visualização.

Do ponto de vista biológico, este facto parece significar a ocorrência de perdas de CO ao longo da corrente sanguínea o que comprova o efeito terapêutico deste composto.

Deste modo, a estrutura obtida permite verificar que o monóxido de carbono presente na estrutura do ALF 850 se vai efectivamente libertando em resultado da interacção com a proteína conforme o previsto. Contudo, estes mesmos dados estruturais mostram unicamente a ocorrência da libertação de CO não permitindo concluir acerca da respectiva velocidade (libertação rápida ou lenta). Neste sentido, embora se tenha confirmado que o ALF 850 possui potencial farmacológico para ser usado enquanto CORM, são necessários estudos complementares para os comprovar e, não menos importante, esclarecer possíveis efeitos tóxicos (optimizando as concentrações de composto administradas) que possibilitem a inclusão do composto testes clínicos e, numa fase posterior, no mercado farmacêutico.

Contudo, será necessário continuar as investigações para se poder confirmar os resultados estruturais supracitados. Se, por um lado, podem existir diferenças entre a reacção do composto com a lisozima quando comparado com as proteínas plasmáticas, não é menos verdade que os dados disponíveis permitiram caracterizar unicamente um dos quatros locais de ligação do ruténio à lisozima.

Assim, deve-se repetir o *soaking* de cristais de lisozima com ALF 850 para conseguir melhores dados estruturais que, juntamente com os dados da Espectroscopia de Infra-vermelhos, permitam uma caracterização mais exacta de todos os aductos lisozima-composto e, a partir das conclusões de tal caracterização, prosseguir para o estudo das suas interacções com as proteínas do sangue.

4.2 – Estudos com Hemoglobina

A inclusão da hemoglobina nos estudos relacionados com os CORMs prende-se com o facto de conseguir associar-se a CO com o prejuízo no transporte de oxigénio já abordado. Assim, por um lado, o conhecimento de possíveis interações entre o CORM e a hemoglobina pode ajudar na caracterização do perfil de segurança do composto e, por outro lado, caso se confirme uma ligação do composto à proteína, pode ajudar a perceber o seu transporte ao longo da corrente sanguínea.

O estudo das interações estabelecidas entre a hemoglobina e diferentes CORMs foi seguido através de três metodologias: Espectroscopia Ultra-violeta/Visível, Espectroscopia de Infra-vermelhos e Cristalografia de Raios-X.

4.2.1 – Espectroscopia Ultra-violeta/Visível

A Espectroscopia Ultra-violeta/Visível (UV/vis) constitui um importante instrumento no estudo das reacções entre a hemoglobina e os CORMs ao conseguir detectar a ligação do CO à proteína e consequente formação de COHb pelo aparecimento de duas bandas características (sensivelmente a 540 e a 575 nm) no espectro ⁶⁸.

Deste modo, prepararam-se duas soluções de hemoglobina comercial, tendo-se adicionado ALF 186 a uma delas e deixado a incubar durante aproximadamente duas horas, e traçaram-se os respectivos espectros UV/vis. Aquando da preparação da amostra, observou-se desde logo que a solução inicial de hemoglobina passou de uma cor castanha para uma cor vermelha imediatamente após a adição do ALF 186 o que parece indicar a ocorrência de algum tipo de reacção resultante do composto (Figura 4.10).

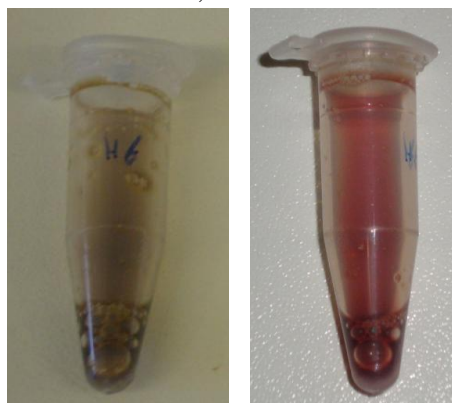


Figura 4.10 – Efeito da adição do ALF 186 à hemoglobina

Antes da adição do ALF 186, a amostra de hemoglobina apresentava uma cor castanha (à esquerda). Imediatamente após a adição do composto, a hemoglobina adquiriu uma cor vermelha (à direita) sugerindo que o composto reage com a proteína (neste caso, com a libertação do CO e posterior ligação à hemoglobina)

De facto, os espectros UV/vis obtidos para a hemoglobina nativa e para a hemoglobina com o ALF 186 não são semelhantes o que confirma a suspeita anterior (Figura 4.11). Analisando os espectros da Figura 4.11, assiste-se a um pequeno desvio da banda de Soret entre as duas amostras (absorvância máxima a 405 nm na hemoglobina nativa face a 417 nm na hemoglobina com o ALF 186), mas é possível constatar que a principal diferença nos espectros se situa, aproximadamente, entre os 500 e os 600 nm.

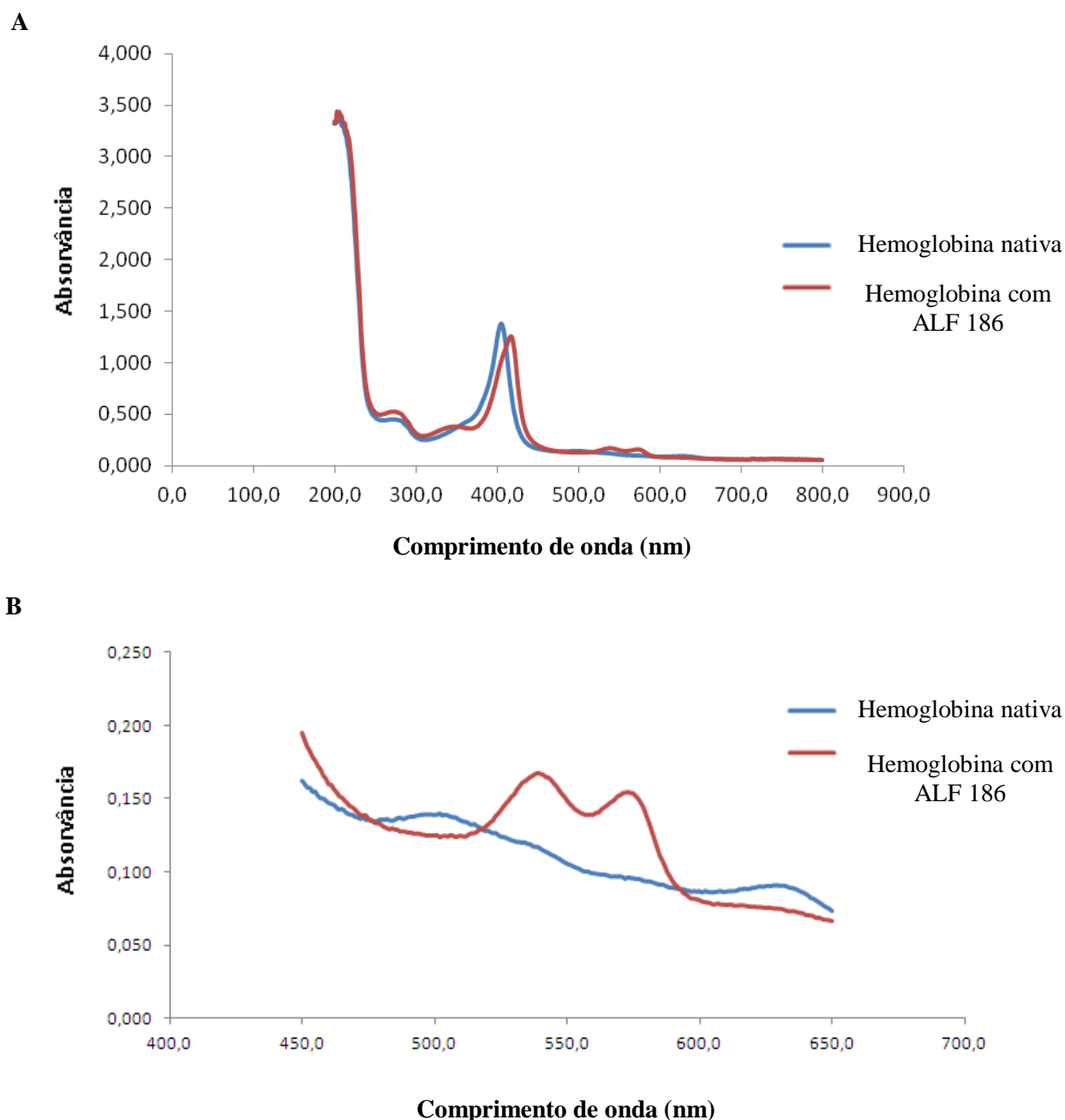


Figura 4.11 – Espectro UV/vis da hemoglobina nativa e da hemoglobina com o ALF 186

A – A sobreposição dos dois espectros torna possível verificar que a adição de ALF 186 à hemoglobina leva a um ligeiro desvio da banda de Soret (aproximadamente a 400 nm). De igual modo, parece que entre os 500 e os 600 nm surgem duas bandas somente no espectro da hemoglobina com ALF 186

B – Restringindo os comprimentos de onda entre 450 e 650 nm, torna-se claro que a adição do ALF 186 levou à formação das duas bandas anteriormente notadas (a 540 e a 575 nm) que correspondem ao espectro da COHb

Neste intervalo de comprimento de onda, aparecem duas bandas (a 540 nm e a 575 nm) unicamente no espectro da amostra de hemoglobina com o ALF 186 correspondendo tipicamente ao espectro da carboxihemoglobina pelo que se comprovou a formação de COHb devido à presença do ALF 186 o que, por sua vez, comprova a capacidade de libertação de CO por parte do composto. Adicionalmente, a mudança instantânea da cor da solução de hemoglobina aquando da adição do composto, parece indicar que esta libertação ocorre de forma rápida.

Assim, pode-se concluir que o ALF 186 consegue interagir com a hemoglobina e libertar monóxido de carbono de modo a actuar sobre as situações clínicas previamente abordadas. Trata-se, pois, de um resultado encorajador para a continuação dos estudos com o composto de modo a determinar a origem do CO libertado – estabelecendo um perfil de segurança do composto – e o mecanismo de transporte do ALF 186 na corrente sanguínea – eventuais interações com proteínas plasmáticas e com a própria hemoglobina – nomeadamente com o recurso à Cristalografia de Raios-X.

De modo semelhante, traçou-se o espectro UV/vis da hemoglobina com o ALF 850, mas não se observou a libertação de CO e a formação de carboxihemoglobina visto o espectro não revelar as bandas características. Assim, deve-se repetir o procedimento de modo a obter resultados que corroborem aqueles obtidos por Espectroscopia de Infra-vermelhos.

4.2.2 – Espectroscopia de Infra-vermelhos

No sentido de se identificar possíveis interações entre a hemoglobina e o ALF 850 por Espectroscopia de Infra-vermelhos, seguiram-se duas metodologias distintas.

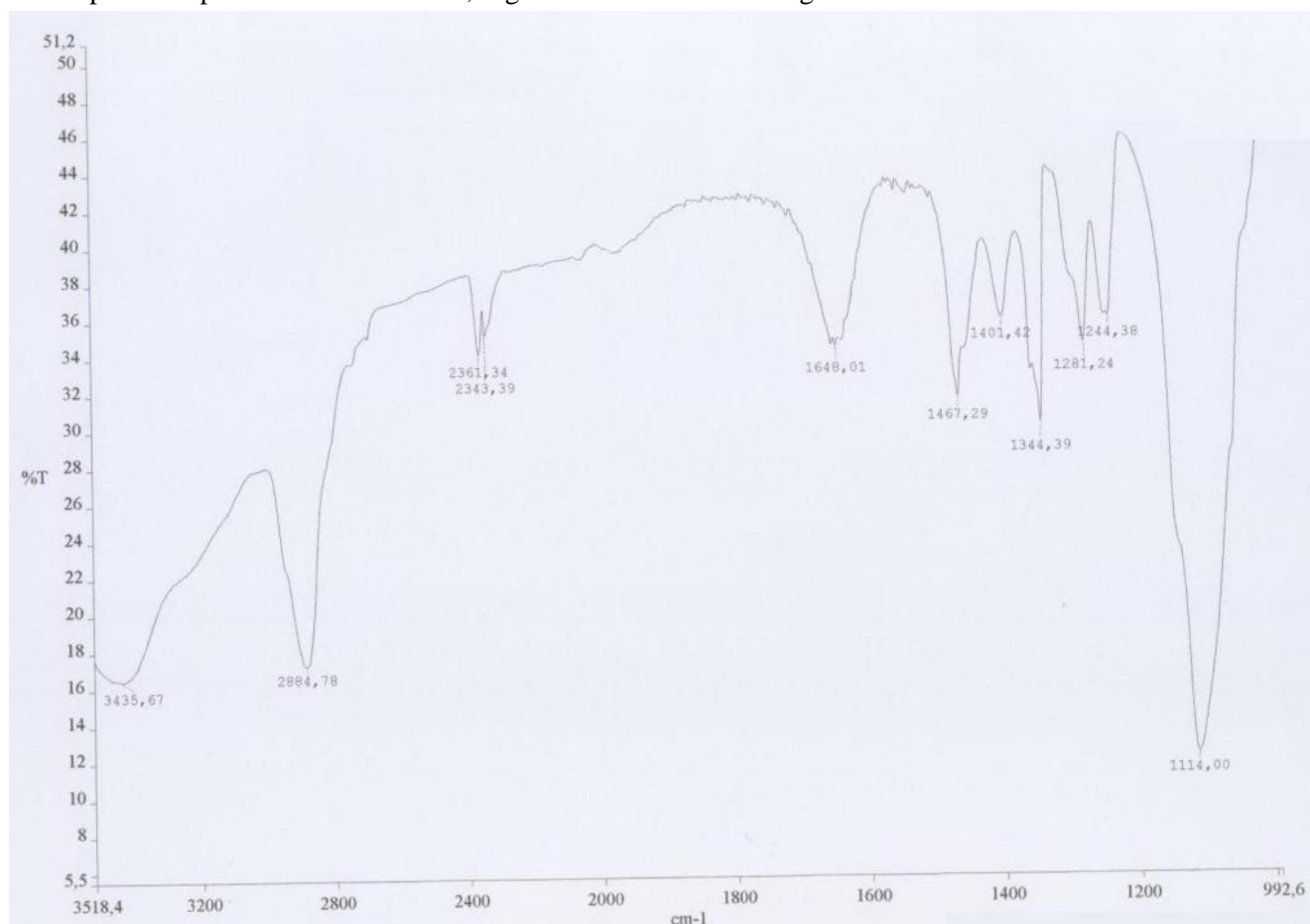


Figura 4.12 – Espectro de infra-vermelhos da amostra de cristais de hemoglobina com ALF 850. Não se observam bandas entre 2060 e 1950 cm⁻¹ o que indica que não houve a formação de aductos entre a proteína e o composto.

Por um lado, e seguindo o procedimento descrito para a lisozima, utilizaram-se parte dos cristais de hemoglobina (cerca de 20 cristais) destinados aos estudos por Cristalografia de Raios-X para realizar *soaking* com o composto durante 24 horas (as condições de obtenção dos cristais estão descritas no sub-capítulo 4.2.3.1) e traçar o respectivo espectro de infra-vermelhos.

Por outro lado, recorreu-se à incubação de hemoglobina comercial (5 mg) com ALF 850 seguida de diálise e de liofilização para se seguir a ligação do composto à proteína em solução. A realização de diálise permite a retirada do excesso do ALF 850 presente em solução (que não reagiu com a proteína) enquanto que a liofilização possibilita o retorno da amostra ao estado sólido para traçar o espectro de infra-vermelhos.

A análise dos espectros de infra-vermelhos dos cristais (Figura 4.12) e da hemoglobina em solução (Figura 4.13) com o ALF 850 revelam resultados contraditórios já que o primeiro não exhibe bandas na zona esperada (entre 2060 e 1950 cm^{-1}) enquanto o segundo apresenta um par de bandas na referida zona (a, aproximadamente, 2035 cm^{-1} e 1957 cm^{-1}); assim, o espectro dos cristais indica a ausência de aductos proteína-composto e o espectro da hemoglobina em solução aponta para a existência desses mesmos aductos.

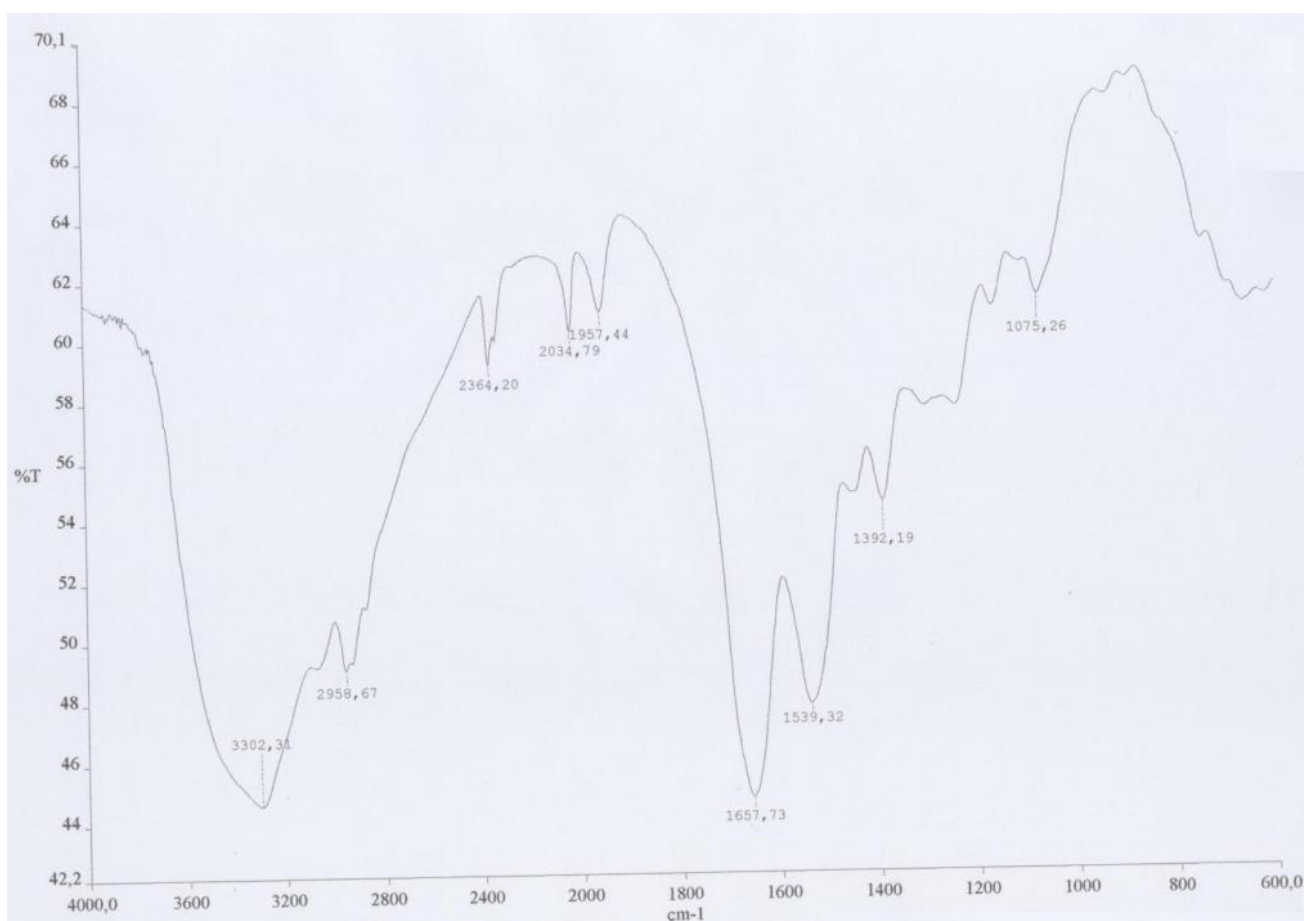


Figura 4.13 – Espectro de infra-vermelhos da amostra de hemoglobina com ALF 850 em solução. Observam-se bandas entre 2060 e 1950 cm^{-1} (a, sensivelmente, 2035 cm^{-1} e 1957 cm^{-1}) o que indica a formação de aductos entre a proteína e o composto

É, pois, à semelhança do sucedido com a lisozima, plausível avançar com o facto do *soaking* não ter resultado ou dos cristais usados não serem em número suficiente para se conseguir detectar o aducto como hipóteses para a ausência de bandas no espectro de infra-vermelhos dos cristais de hemoglobina. Neste sentido, deve-se repetir o *soaking* com o ALF 850 aumentando o número de cristais de hemoglobina empregues na elaboração do espectro de infra-vermelhos.

Ainda assim, os dados recolhidos com a hemoglobina em solução, juntamente com as observações das pesquisas já realizadas, abrem boas perspectivas para a capacidade de ligação do composto à hemoglobina. Se o desenrolar dos estudos confirmar esta ligação e permitir a sua caracterização, ir-se-á aumentar os conhecimentos sobre a acção e transporte do ALF 850 e, consequentemente, aferir acerca das hipóteses de passagem a fármaco.

4.2.3 – Cristalografia de Raios-X

Tal como com a lisozima, os diferentes passos necessários no estudo por Cristalografia de Raios-X levam a que seja mais perceptível apresentar os Resultados e respectiva Discussão em quatro secções distintas. Salienta-se o facto dos passos de resolução da estrutura da hemoglobina serem similares aos seguidos com a lisozima pelo que a sua interpretação se encontra descrita com maior grau de detalhe no sub-capítulo 4.1.2

4.2.3.1 – Ensaio de cristalização

Tendo-se efectuado os vários ensaios de cristalização indicados na secção de Material e Métodos, na Tabela 4.6 encontram-se as condições nas quais se obtiveram melhores cristais que partilham a concentração de proteína (60 mg/ml) e a temperatura de cristalização (20 °C).

Tabela 4.6 – Condições, tipo de gota e temperatura de cristalização empregues na obtenção de cristais de hemoglobina

Concentração e tampão da Hemoglobina	Condições de cristalização	Tipo de gota	Temperatura de cristalização
60 mg/ml Tampão Tris-HCl 20 mM (pH=8.2)	20% PEG 4K/ 0.2 M NH ₄ Cl (poço e gota)	Gota suspensa 2+2	20 °C
	10% PEG 4K/ 0.2 M NH ₄ Cl (poço e gota)	Gota suspensa 2+2	
	20% PEG 4K/ 0.2 M NH ₄ I	Adição de 4 µl de proteína ao poço (700 µl)	
	20% PEG 4K/ 0.2 M NH ₄ Cl	Adição de 3,4,5 ou 6 µl de proteína ao poço (500 µl)	

Salienta-se o facto de tanto o cloreto de amónio (NH_4Cl) como o iodeto de amónio (NH_4I) originarem cristais de hemoglobina. Todavia, é preferível evitar o uso de NH_4I já que exhibe um sinal anómalo que, aquando do tratamento dos dados, se pode confundir com o sinal anómalo gerado pelos metais de transição dos ALFs.

Por outro lado, paralelamente aos ensaios de gota suspensa (*hanging drop*) com 2 μl de proteína e 2 μl de solução precipitante (Figura 4.14), efectuaram-se de igual modo ensaios em que, substituindo as gotas, se adicionou directamente a hemoglobina (3,4,5 ou 6 μl) no poço com a solução precipitante (500 ou 700 μl). O recurso a esta metodologia deveu-se ao facto de muitos dos cristais obtidos por gota suspensa apresentarem grandes dimensões obrigando a que sejam partidos o que, embora torne possível a prossecução dos estudos, pode ter reflexos na qualidade da sua difracção: a adição da proteína ao poço permitiu a obtenção de cristais únicos e de tamanho adequado às experiências de difracção (Figura 4.15). Independentemente da técnica de obtenção, os cristais (facilmente reconhecíveis pela coloração vermelha) cresceram até valores compreendidos entre 0.05 e 0.2 mm num espaço temporal de 48 horas após o qual se procedeu ao *soaking* com vários compostos de modo a conseguir-se a sua incorporação nos cristais de hemoglobina (com uma concentração de cerca de 20 mM) conforme indicado na Tabela 4.7.

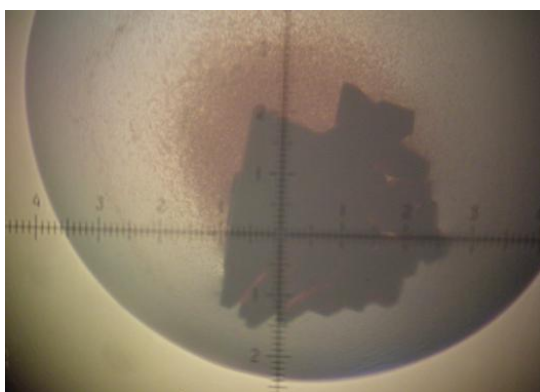


Figura 4.14 – Cristais de hemoglobina obtidos nos ensaios de gota suspensa
Cristais obtidos com 20% PEG 4K/ 0.2 M NH_4Cl

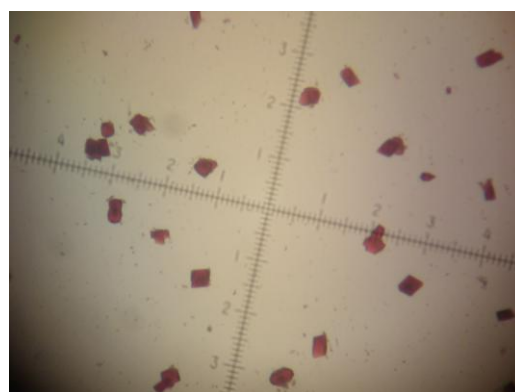


Figura 4.15 – Cristais de hemoglobina obtidos pela adição de 5 μl de proteína no poço com 700 μl de solução precipitante
Cristais obtidos com 20% PEG 4K/ 0.2 M NH_4Cl e com um tamanho de, aproximadamente, 0.1 mm

Prolongou-se o *soaking* durante 24 horas ao fim das quais se observaram as gotas verificando-se a sobrevivência dos cristais e a dissolução dos vários compostos (adicionados aos poços) o que parece apontar para o sucesso do *soaking*.

Assim, foi possível passar à recolha e congelamento em azoto líquido dos melhores cristais com os diferentes compostos para posterior análise por radiação de Sincrotrão no ESRF e no Soleil usando paratona como solução crio-protectora.

Tabela 4.7 – Resumo das condições e resultados de difracção dos cristais de hemoglobina analisados por radiação de Síncrotrão (ESRF e Soleil)

Em todas as condições, a concentração de hemoglobina é igual a 60 mg/ml (em tampão Tris-HCl 20 mM, pH=8.2) e os compostos possuem uma concentração de 20 mM

Informações sobre o <i>soaking</i>	Condições de cristalização	Tipo de gota	Linha de Síncrotrão	Resultado de difracção
ALF 186 Adição de 0.5 µl à gota	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	Gota suspensa 2+2	ID 23-1 ESRF	Resolução de 2.4 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	Gota suspensa 2+2	ID 23-1 ESRF	Resolução de 1.9 Å
ALF 475 Adição de 2.8 mg no poço com 700 µl	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 6 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3.4 Å
ALF 486 Adição de 2.7 mg no poço	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3 Å
ALF 487 Adição de 2.6 mg no poço	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Má difracção
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3.1 Å
ALF 554 Adição de 1.9 mg no poço	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 2 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 2 Å
	20% PEG 4K 0.2 MNH ₄ Cl	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 1.9 Å
ALF 794 Adição de 2.2 mg no poço	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Não difractou
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Não difractou
ALF 794 Adição de 0.5 µl à gota	20% PEG 4K 0.2 MNH ₄ Cl	Gota suspensa 2+2	ID 14-1 ESRF	Resolução de 2 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	Gota suspensa 2+2	ID 14-1 ESRF	Resolução de 1.8 Å
ALF 850 Adição de 1.8 mg no poço	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ I	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 2 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3.1 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 3.2 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	4 µl proteína em 700 µl no poço	ID 14-1 ESRF	Resolução de 2.4 Å
ALF 850 Adição de 0.5 µl à gota	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	Gota suspensa 2+2	ID 14-1 ESRF	Resolução de 2 Å
	20% PEG 4K 0.2 M NH ₄ Cl	Gota suspensa 2+2	Proxima I Soleil	Resolução de 1.8 Å

Na Tabela 4.7, encontram-se resumidas as condições observadas para os cristais analisados podendo-se verificar que os resultados de difracção variam desde a sua inexistência até à difracção a altas resoluções.

Conseguiram-se obter resultados interessantes com o ALF 554 que, no entanto, tal como com a lisozima, não podem ser divulgados por questões de propriedade intelectual. Assim sendo, optou-se por processar os dados relativos ao cristal de hemoglobina com o ALF 850 (Soleil) apresentando-se nos sub-capítulos seguintes os passos necessários para a resolução da estrutura tridimensional do complexo.

4.2.3.2 – Experiência de difracção – Hemoglobina + ALF 850

Conforme mencionado, o cristal de hemoglobina com o ALF 850 difractou até 1.79 Å (recolha de dados a um comprimento de onda de 0.99 Å) pretendendo-se determinar os índices de Miller (hkl) com as respectivas intensidades (I_{hkl}) e o erro associado (σ_{hkl}) no padrão de difracção (Figura 4.16).

Para tal, recorreu-se ao programa Mosflm que, após indexar as 100 imagens recolhidas do cristal no Sincrotrão, obteve os parâmetros característicos da célula unitária (constantes a , b , c e ângulos α , β , γ). Assim, os dados obtidos permitem verificar que o cristal em estudo possui os seguintes parâmetros: $a=63.41$, $b=77.14$, $c=109.14$ Å e $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$.

Atendendo a que $a \neq b \neq c$ e que $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, constata-se que o cristal pertence ao sistema cristalino ortorrômbico sendo que o grupo espacial foi determinado pela ferramenta *Pointless* do CCP4: com uma probabilidade de 93.4%, o cristal de hemoglobina com o composto ALF 850 pertence ao grupo espacial $P2_12_12_1$.

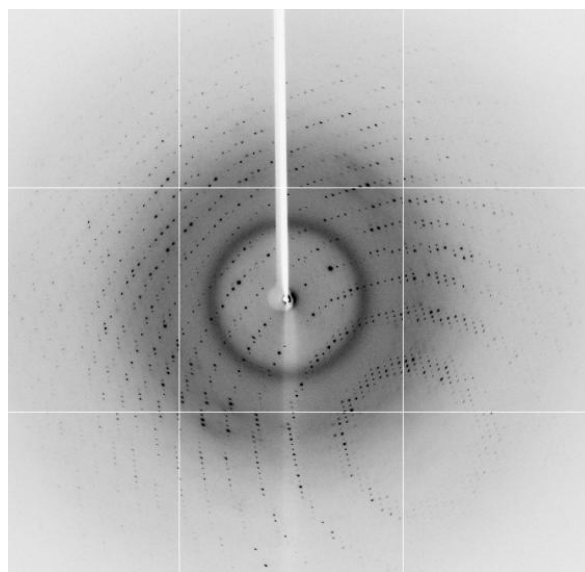


Figura 4.16 – Padrão de difracção do cristal de hemoglobina com o ALF 850

Seguiu-se o recurso ao programa *Scala* do CCP4 para escalar os dados e obter-se as estatísticas para a avaliação da sua qualidade (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 – Estatísticas de qualidade dos dados de difracção e coeficiente de Matthews do cristal de hemoglobina com o ALF 850

Multiplicidade = Total de reflexões medidas / Total de reflexões únicas

$$R_{merge} = \frac{\sum |I_k| - \langle I \rangle}{\sum |I_k|} \quad VM = \frac{\text{Volume da célula unitária}}{\text{Massa da célula unitária}} \quad \text{Conteúdo em solvente} = 1 - (1.23/V_M)$$

Parâmetro	Resultados globais	Camada externa de resolução
Resolução	48.98 - 1.79 Å	1.89 - 1.79 Å
<I/σI>	10.4	1.7
Multiplicidade	3.8	3.7
Número de Reflexões totais	171797	27017
Número de Reflexões únicas	44910	7242
R_{merge}	7.10%	81.90%
Mosaicidade		0.6
Completeness	87.70%	98.20%
Número de moléculas por unidade assimétrica		1
Coeficiente de Matthews (V_M)		2.06 Å/Dalton
Conteúdo em solvente		40.42%

A avaliação dos dados constantes da Tabela 4.8 revela bons indicadores para a continuação da resolução da estrutura (de acordo com o discutido previamente para a lisozima), abordada no próximo sub-capítulo.

4.2.3.3 – Resolução da estrutura – Hemoglobina + ALF 850

Tal como com a lisozima, visto a estrutura da hemoglobina estar igualmente bem caracterizada, a determinação das fases (imprescindível na resolução da estrutura da hemoglobina com o ALF 850) foi conseguida através do Método de Substituição Molecular (*Molecular Replacement*) recorrendo ao programa *Phaser* do CCP4.

Começou-se por identificar, na base de dados PDB, uma estrutura já determinada de hemoglobina tendo-se verificado que a estrutura com o código 2QSS reúne as condições ideais para ser usada na Substituição Molecular: provém de gado bovino (nome científico *Bos taurus*), partilha o grupo espacial com a estrutura em estudo, foi resolvida a uma alta resolução e não possui ligandos ⁶⁹.

Após a escolha da estrutura semelhante à estrutura em estudo e o número de moléculas na unidade assimétrica (Tabela 4.8), é possível então utilizar o *Phaser* para a Substituição Molecular. Os dados provenientes do *Scala* e da estrutura 2QSS permitem ao *Phaser*, através de mecanismos de rotação e de translação, resolver as fases e, consequentemente, a estrutura.

A análise dos resultados, tanto da rotação (LLG de 573.56 e *Z-score* de 30.17) como da translação (LLG de 2248.44 e *Z-score* de 47.3), permite afirmar que se obteve uma boa solução.

Por outro lado, após a correcta resolução da estrutura, procurou-se melhorar as fases recorrendo ao programa DM do CCP4.

4.2.3.4 – Refinamento da estrutura – Hemoglobina + ALF 850

Depois de se conseguir determinar a densidade electrónica e o modelo, passou-se para o refinamento da estrutura através do programa *Refmac5* do CCP4 que, executando 10 ciclos de refinamento, devolveu dois novos ficheiros mtz e PDB com, respectivamente, a densidade electrónica e o modelo refinados bem como as estatísticas sobre o refinamento (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 – Estatísticas do refinamento inicial da estrutura de hemoglobina com o ALF 850

Parâmetro	Refinamento inicial
Factor R	0.2527
<i>R_{free}</i>	0.3007
RMSD para o comprimento de ligação	0.0267 Å
RMSD para o ângulo de ligação	2.1056°

Tal como descrito para o caso da lisozima, começou-se por verificar se, na presente estrutura, ocorreu alguma ligação do ALF 850 à hemoglobina. Para tal, procedeu-se à criação de um mapa anómalo (recorrendo aos programas *Scala*, *CAD* e *FFT* do CCP4) para auxiliar na detecção dos átomos de ruténio do ALF 850 no Coot. Procurou-se densidade correspondente aos átomos de ruténio (com densidade $2F_o - F_c$, densidade $F_o - F_c$ positiva e densidade anómala), mas não se encontrou nenhuma localização possível para os mesmos. Deste modo, o ALF 850 não se incorporou no cristal de hemoglobina pelo que não se pode retirar conclusões com estes dados e deixa de fazer sentido prosseguir o refinamento da estrutura. Ainda assim, torna-se importante avançar com razões explicativas da ausência de interações entre a hemoglobina e o ALF 850.

Uma possível causa reside no facto do ALF 850 não ter a capacidade de se ligar à hemoglobina. Contudo, esta hipótese parece, desde logo, estar desfasada da realidade já que os estudos realizados até agora apontam para o estabelecimento de ligações entre proteínas (entre as quais a hemoglobina) e metais de transição (como o ruténio) nomeadamente o recurso à técnica de ICP (sigla para *Induction Coupled Plasma*)⁵⁰. De modo idêntico, os resultados dos estudos com a hemoglobina previamente descritos no sub-capítulo anterior evidenciam uma interacção entre a proteína e o composto – a espectroscopia de infra-vermelhos indicia a formação de aductos proteína-composto em

solução – pelo que parece seguro considerar que a ligação entre a hemoglobina e o ALF 850 se verifica efectivamente.

Deste modo, parece mais provável que a inexistência de ligações entre a hemoglobina e o ALF 850 no presente caso de estudo se deva à ineficácia do *soaking* realizado que impediu a incorporação do composto no cristal de hemoglobina. Em alternativa, é ainda possível que o *soaking* tenha resultado, mas que as moléculas de ALF 850 presentes na estrutura estejam de tal forma desordenadas que se torne impossível visualizá-las na densidade electrónica.

Assim, deve-se repetir o *soaking* dos cristais de hemoglobina com ALF 850 de forma a conseguir-se avaliar as interacções proteína-composto; o insucesso do *soaking* realizado neste estudo levanta a hipótese da concentração do composto ter sido insuficiente para a ligação com a hemoglobina pelo que se deve proceder ao aumento da concentração do ALF 850 nas experiências posteriores. Por outro lado, em alternativa ao *soaking*, pode-se ainda incubar a hemoglobina com o ALF 850 e tentar a co-cristalização de modo a maximizar as hipóteses da formação de cristais proteína-composto e possibilitar a posterior análise e determinação da estrutura tridimensional.

4.3 – Estudos com Albumina

A determinação das interacções estabelecidas entre a albumina e os CORMs torna-se importante já que a albumina é a proteína plasmática mais abundante reconhecendo-se-lhe uma elevada capacidade de transportar diversos produtos naturais ou farmacêuticos.

Assim, é previsível que os CORMs se liguem à albumina de modo a circularem na corrente sanguínea até às zonas afectadas sendo que a caracterização de tal ligação pode ajudar a esclarecer eficazmente como se processa o transporte dos CORMs e, em simultâneo, elucidar sobre a libertação do CO do composto para exercer os efeitos terapêuticos.

O estudo das interacções entre a albumina e os CORMs foi, nesta fase, seguido somente por Cristalografia de Raios-X.

4.3.1 – Ensaios de cristalização

Nos ensaios anteriormente realizados, a albumina nunca originou cristais adequados para o uso em Cristalografia de Raios-X. Como tal, resolveu-se iniciar o presente estudo por reproduzir as condições de cristalização descritas na literatura: *screen* de 22 a 30% PEG 4K e 50 mM de tampão fosfato de potássio, usando albumina comercial com uma concentração de 100 mg/ml e empregando o método de difusão de vapor: gota assente (*sitting drop*) de 2 µl de proteína e 2 µl de solução precipitante. Salienta-se ainda o facto de se ter repetido as condições anteriores a 4 °C e a 20 °C de modo a aumentar as hipóteses de cristalização.

Contudo, não se observou a formação de cristais em nenhuma das condições usadas independentemente da temperatura. Assim, sabendo-se que a cristalização é um processo complexo em que a mínima alteração das condições pode fazer a diferença entre conseguir ou não obter cristais, optou-se por efectuar ensaios de *sreening* na tentativa de se conseguir determinar novas condições de cristalização reproduzíveis ao longo do trabalho.

Para tal, usaram-se os *screens* de cristalização JBS1,2,3,4 e JCSG+ da Jena BioScience. Tendo em conta que se pretende uma primeira aproximação às condições de cristalização, o ideal passa por experimentar o máximo de condições com o menor consumo possível de proteína pelo que se usou o robô de cristalização na preparação das placas. Neste sentido, repetiram-se desde logo os *screens* referidos com a albumina a 100 mg/ml e a 150 mg/ml para albergar um maior número de condições (a uma temperatura de 4 °C).

Na Tabela 4.10, sintetizam-se as condições em que se verificaram os melhores resultados que incluem microcristais muito pequenos (com diâmetro inferior a 0.05 mm) bem como algumas formas irregulares salientando-se o facto da albumina a 150 mg/ml aparentar melhores resultados. Repetiram-se as condições da Tabela 4.10 na tentativa de obter cristais satisfatórios, mas esta abordagem não foi bem sucedida e não se conseguiram cristais de qualidade com as condições seleccionadas.

Tabela 4.10 – Condições e temperatura de cristalização empregues na obtenção de cristais de albumina (100 e 150 mg/ml)

HEPES – (4- (2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfónico); MES – Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; Tris – Tris(hidroximetil)aminometano; PolyvpK15 – Polivinilpirrolidona K15

Screen de cristalização	Condição de cristalização	Concentração de albumina	Temperatura
JBS1 (7)	28% PEG 400; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de cálcio	100 mg/ml	4 °C
JBS1 (14)	25% PEG 550; 0.1 M MES pH=6.5; 0.01M Sulfato de zinco	150 mg/ml	
JBS4 (91)	10% PEG 8K; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Acetato de sódio	100 mg/ml	
JCSG+ (27)	20% PEG 4K; 0.2 M Nitrato de amónio	150 mg/ml	
JCSG+ (38)	30% PEG 400; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de magnésio	150 mg/ml	
JCSG+ (47)	14% Isopropanol; 0.07 M Tampão Acetato de sódio pH=4.5; 30% Glicerol; 0.14 M Cloreto de cálcio	100 e 150 mg/ml	
JCSG+ (75)	20% PolyvpK15; 0.1 M Tris pH=8.5; 0.1 M Cloreto de cobalto	100 mg/ml	
JCSG+ (88)	45% MPD; 0.1 M Bis-Tris pH=5.5; 0.2 M Cloreto de cálcio	100 mg/ml	

Optou-se então por aproveitar alguns dos cristais da última repetição para se realizar *seeding* nos ensaios seguintes. Nesta técnica, empregam-se cristais imperfeitos ou demasiados pequenos previamente obtidos para melhorar a qualidade dos cristais ao adicionar pequenos núcleos já formados à gota de cristalização de modo a favorecer a nucleação e consequente cristalização. Assim, usaram-se os *screens* de cristalização PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K e JBS3 nos ensaios de *seeding* (reproduzindo-se as condições usadas anteriormente).

Na Tabela 4.11, encontram-se as condições mais promissoras em que foi possível observar a existência de cristais aparentemente regulares, mas sempre de pequenas dimensões (aproximadamente 0.05 mm).

Tabela 4.11 – Condições de cristalização empregues na obtenção de cristais de albumina (150 mg/ml) após *seeding*

Screen de cristalização	Condição de cristalização	Concentração de albumina	Temperatura
PEG/Ion 4K (29)	20% PEG 4K; 0.2 M Acetato de potássio	150 mg/ml	4 °C
PEG/Ion 4K (38)	20% PEG 4K; 0.2 M Tartarato de amónio		
PEG/Ion 4K (39)	20% PEG 4K; 0.2 M Fosfato di-hidrogénio de sódio		
PEG/Ion 4K (41)	20% PEG 4K; 0.2 M Fosfato di-hidrogénio de potássio		
PEG/Ion 4K (43)	20% PEG 4K; 0.2 M Fosfato de amónio		
PEG/Ion 8K (33)	20% PEG 8K; 0.2 M Sulfato de sódio		
PEG/Ion 4K (39)	20% PEG 8K; 0.2 M Fosfato di-hidrogénio de sódio		
PEG/Ion 8K (43)	20% PEG 4K; 0.2 M Fosfato de amónio		

Ainda assim, resolveu-se usar as condições presentes na Tabela 4.11 na próxima etapa do trabalho experimental que passa pela obtenção de cristais de albumina com moléculas de diferentes compostos (ALF 190, ALF 475 e ALF 486) incorporados. Contrariamente ao descrito para a lisozima e para a hemoglobina, não se tentou o *soaking* de cristais já formados visto que, devido à natureza frágil dos cristais de albumina, ir-se-ia correr o risco de se partirem e, consequentemente, de os inutilizar ⁶³; em alternativa, incubou-se a albumina com o composto de interesse e só depois se realizaram os ensaios de cristalização (co-cristalização) nas condições descritas.

Com a exceção de um cristal com o ALF 475, todos os microcristais que surgiram nas 48 horas seguintes à realização das placas possuíam um tamanho tão reduzido que inviabilizava a sua utilização nos passos posteriores. Assim, procedeu-se à recolha e ao congelamento em azoto líquido do cristal com ALF 475 (Figura 4.17) com cerca de 0.1 mm (o crio-protector empregue consistiu numa

solução de igual composição à condição de cristalização com a adição de 25% de glicerol) para posterior análise por radiação de Sincrotrão no ESRF (Tabela 4.12).

Tabela 4.12 – Resumo das condições e resultados de difracção do cristal de albumina analisado por radiação de Sincrotrão (ESRF)

Proteína	Co-cristalização com	Condições de cristalização	Crio-protector	Linha de Sincrotrão	Resultado de difracção
Albumina 150 mg/ml	ALF 475	20% PEG 4K; 0.2 M Tartarato de amónio	25% glicerol; 20% PEG 4K; 0.2 M Tartarato de amónio	ID 14-4 ESRF	Sal

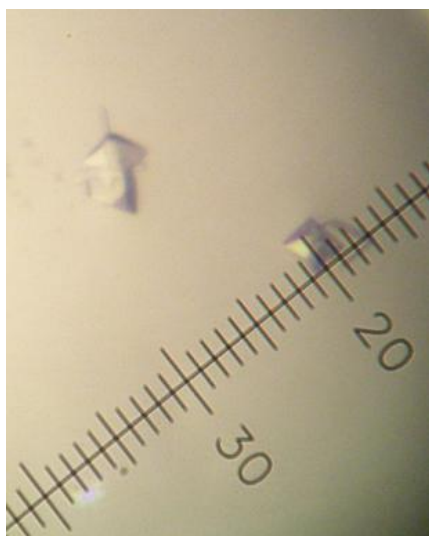


Figura 4.17 – Cristal de albumina com ALF 475 obtido nos ensaios de co-cristalização. Cristais obtidos com 20% PEG 4K; 0.2 M Tartarato de amónio e com um tamanho de, aproximadamente, 0.1 mm

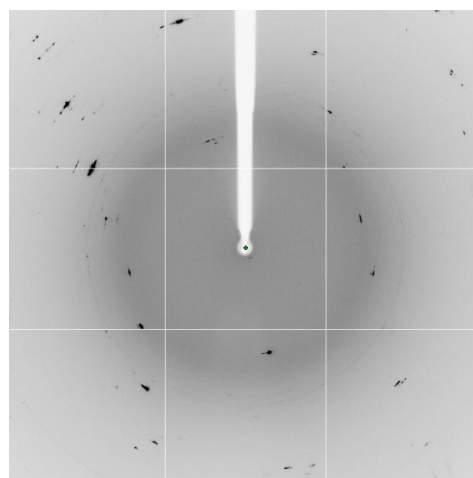


Figura 4.18 – Padrão de difracção do cristal de albumina com o ALF 475. A comparação com os padrões de difracção da lisozima e da hemoglobina permite verificar que se trata de um cristal de sal

Os resultados de difracção (Figura 4.18) revelam que o cristal analisado era sal e não de natureza proteica (o padrão de difracção obtido é diferente dos conseguidos para a lisozima e para a hemoglobina) o que significa que não se conseguiu a cristalização da albumina. Olhando para as condições de cristalização (Tabela 4.12), constata-se que se encontra presente tartarato de amónio conhecido, tal como a generalidade dos sais de amónio, por cristalizar com facilidade neste tipo de experiências e se confundir com cristais de proteínas quando estes são incolores (como é o caso da albumina).

Por outro lado, atentando nas condições em que se conseguiram os melhores cristais (Tabela 4.11), além de sais de amónio, verifica-se uma predominância de fosfatos e sulfatos igualmente capazes de cristalizarem e passarem por cristais proteicos. Assim, parece provável a totalidade (ou pelo menos, a esmagadora maioria) dos cristais obtidos serem, na realidade, sal; corroborando esta

suspeita, salienta-se o facto dos cristais serem muito semelhantes em todas as condições e ainda terem surgido num período de tempo muito curto contrariamente ao indicado na literatura.

Deste modo, é necessário prosseguir com os ensaios de cristalização de modo a conseguir-se determinar as melhores condições de obtenção de cristais de albumina (para depois ser possível realizar estudos de co-cristalização e caracterizar as interacções estabelecidas entre a albumina e diferentes ALFs) através do uso de novos testes de *screening* (empregando diferentes *screens* de cristalização) e da alteração da concentração da proteína (a albumina apresenta uma grande solubilidade pelo que a sua cristalização pode requerer uma concentração mais elevada do que aquela usada). Adicionalmente, pode-se ainda tentar ensaios a 20 °C de forma a verificar a influência da temperatura na cristalização e, caso se consigam cristais imperfeitos, aproveitá-los para realizar *seeding* em novos testes.

Em paralelo, além do tradicional melhoramento das condições de cristalização, deve-se de igual forma verificar o estado da albumina já que a presença de dímeros (resultantes do estabelecimento de ligações dissulfureto entre diferentes moléculas) diminui as hipóteses de se conseguirem bons cristais. Assim, caso se confirme a presença dos dímeros (por exemplo, realizando uma electroforese em condições nativas ou recorrendo à análise por espectrometria de massa) é conveniente removê-los através de uma cromatografia de filtração em gel (proporcionando uma separação com base no peso molecular) e repetir os ensaios de cristalização de maneira a verificar se a qualidade dos cristais efectivamente melhorou.

Em conclusão, não se conseguiram encontrar as condições de cristalização da albumina pelo que não foi possível seguir as interacções entre a proteína e os vários ALFs e caracterizar a eventual formação de aductos proteína-composto. É, pois, imprescindível investir na obtenção de cristais de qualidade para se conseguir descrever com maior precisão os mecanismos de acção dos compostos candidatos a CORMs.

4.4 – Estudos com Transferrina

Tal como com a albumina, a caracterização pormenorizada das interacções entre a transferrina do soro humano e os CORMs revela-se importante para a compreensão alargada do funcionamento e do transporte dos mesmos.

A transferrina possui a capacidade de estabelecer ligações, não só com o ferro férrico (Fe^{3+}), mas também com outros compostos presentes na estrutura dos CORMs pelo que se poderá assistir à formação de aductos proteína-composto responsáveis pela sua estabilidade e mobilidade na corrente sanguínea⁴⁸.

Após a sobre-expressão e a purificação da proteína, o estudo das interacções entre a transferrina e os CORMs foi seguido por Cristalografia de Raios-X.

4.4.1 – Sobre-expressão em *Pichia pastoris* e purificação

No presente estudo, tem-se como objectivo obter cristais de transferrina na presença dos ALFs. Contudo, verifica-se que a ligação de pequenas moléculas à proteína é responsável pelo assumir de uma conformação fechada por parte da transferrina que, até à data, nunca foi cristalizada. De modo a ultrapassar esta limitação, recorreu-se à sobre-expressão do lóbulo N-terminal da transferrina do soro humano (de sigla N-TSH) e não da proteína com os dois lóbulos.

Foi então necessário escolher um sistema de expressão tendo a escolha recaído sobre a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* já que, ao contrário dos sistemas de expressão procariontes (nomeadamente *E. coli*), consegue efectuar as modificações pós-traducionais necessárias para a obtenção da proteína numa forma funcional (designadamente o estabelecimento de pontes dissulfureto e a glicosilação da Serina 32)^{66,70}.

As metodologias de Biologia Molecular necessárias à obtenção dos clones de *Pichia pastoris* com o gene do N-TSH foram realizadas anteriormente pela Doutora Teresa Santos-Silva (Requimte, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa) pelo que foi possível passar directamente para o passo de sobre-expressão da proteína de acordo com o protocolo descrito⁶⁶.

Neste sistema, a indução da expressão da proteína de interesse é conseguida pela adição de metanol sendo que a mesma é expressa para o meio de cultura. Assim, os dois passos de indução com metanol foram seguidos através de electroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE (Figuras 4.19 e 4.20) sendo possível observar que, ao longo dos cinco dias de indução, a quantidade de N-TSH existente no meio de cultura aumenta conforme mostra a nitidez crescente das respectivas bandas nos géis (situadas, aproximadamente, a 37 kDa que corresponde ao peso molecular do N-TSH). Esta observação atesta o sucesso da sobre-expressão da proteína podendo-se concluir que a adição de metanol é eficaz na indução das células e que a produção do N-TSH em *Pichia pastoris* é, efectivamente, um excelente método para a obtenção da proteína de interesse.

Assim, tendo-se estabelecido os princípios da sobre-expressão, torna-se necessário proceder à purificação da proteína para poder usá-la nos ensaios de cristalização. O N-TSH é libertado para o meio de cultura (cerca de 1 litro) pelo que, o primeiro passo de purificação, passa por filtrá-lo de modo a descartar as células existentes. De seguida, pretende-se recuperar a proteína num volume muito menor (aproximadamente 25 ml) seguindo-se, para tal, dois métodos distintos – filtração com o aparelho experimental *Vivacell 250* e precipitação com sulfato de amónio – para determinar qual o mais adequado ao presente caso de estudo.

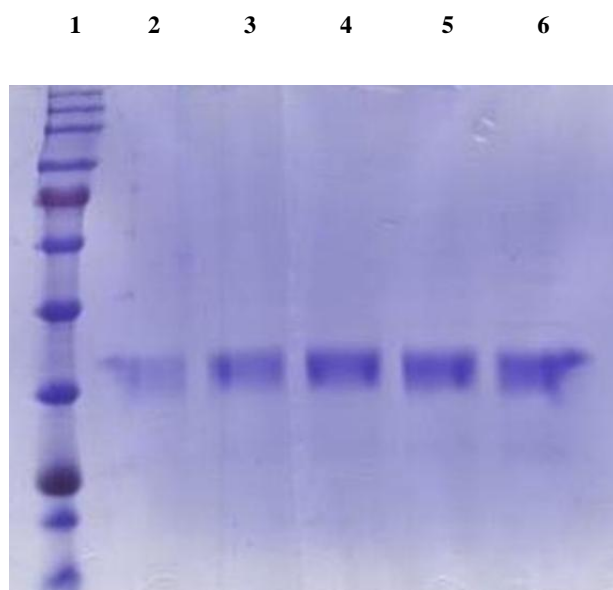


Figura 4.19 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da primeira indução do N-TSH
1 – Marcador de pesos moleculares (de cima para baixo): 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20 e 17 kDa; **2** – Amostra do primeiro dia de indução; **3** – Amostra do segundo dia de indução; **4** – Amostra do terceiro dia de indução; **5** – Amostra do quarto dia de indução; **6** – Amostra do quinto dia de indução

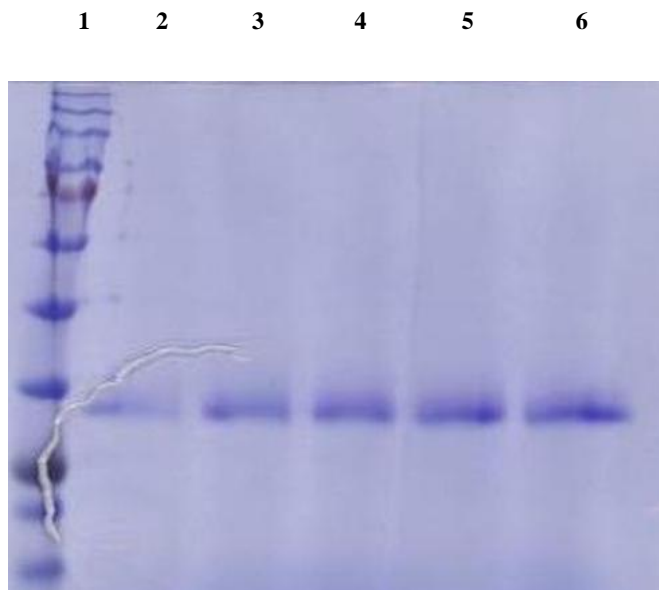


Figura 4.20 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da segunda indução do N-TSH
1 – Marcador de pesos moleculares (de cima para baixo): 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20 e 17 kDa; **2** – Amostra do primeiro dia de indução; **3** – Amostra do segundo dia de indução; **4** – Amostra do terceiro dia de indução; **5** – Amostra do quarto dia de indução; **6** – Amostra do quinto dia de indução

No primeiro, existe uma membrana vertical com poros de 10 kDa pela qual se faz passar o meio de cultura através do uso de pressão (realce-se ainda o facto de se colocar a amostra em agitação orbital para prevenir a precipitação da proteína na membrana). Como o N-TSH tem um peso molecular de cerca de 37 kDa, a proteína fica retida na membrana enquanto o meio de cultura é progressivamente eluído e, deste modo, é possível recuperá-la no volume pretendido ao mesmo tempo que se procede à mudança de tampão (para 10 mM de tampão Tris-HCl, pH=8.0).

Já no segundo, a adição de sulfato de amónio potencia a precipitação das proteínas presentes no meio de cultura sendo necessário determinar qual a percentagem de sulfato de amónio adequada para a recuperação do N-TSH; é posteriormente possível dissolver o precipitado no volume de tampão pretendido e, conseqüentemente, obter um menor volume final.

Os resultados dos dois métodos de purificação foram seguidos através de electroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE (Figuras 4.21 e 4.22). A análise da Figura 4.21 revela uma banda forte a 37 kDa para a amostra de N-TSH sujeita a filtração no *Vivacell 250* e a ausência de bandas nos respectivos eluídos comprovando a correcta recuperação da proteína. Por outro lado, a Figura 4.22 mostra que todas as concentrações de sulfato de amónio testadas (20, 40, 60 e 80%) exibem uma banda a 37 kDa (embora seja mais pronunciada nas duas últimas) o que indica que a recuperação da proteína não foi totalmente eficaz.

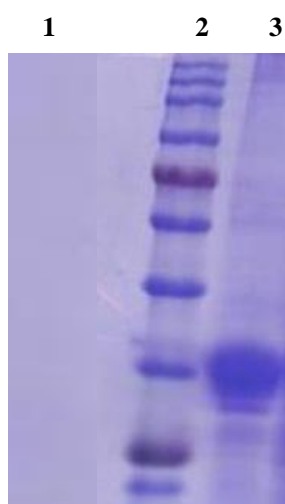


Figura 4.21 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da purificação do N-TSH por filtração com o *Vivacell 250*

1 – Eluído do *Vivacell 250*; **2** – Marcador de pesos moleculares (de cima para baixo): 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25 e 20 kDa; **3** – Amostra de N-TSH purificada

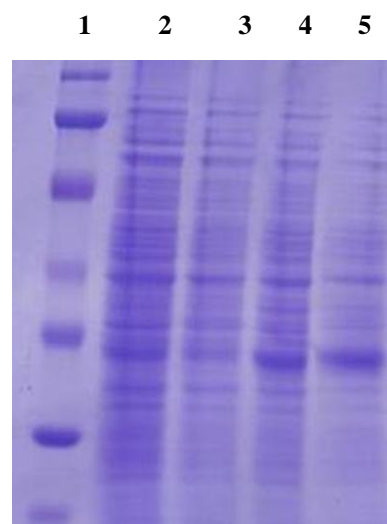


Figura 4.22 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados da purificação do N-TSH por precipitação com sulfato de amónio

1 – Marcador de pesos moleculares (de cima para baixo): 188, 123, 78, 54, 41, 27 e 19 kDa; **2** – 20% de sulfato de amónio; **3** – 40% de sulfato de amónio; **4** – 60% de sulfato de amónio; **5** – 80% de sulfato de amónio

Deste modo, a comparação dos resultados anteriores permite concluir que a filtração no *Vivacell 250* é mais eficaz na recuperação do N-TSH quando comparada com a precipitação com sulfato de amónio. De facto, ao não se conseguir determinar uma concentração óptima de sulfato de amónio para o isolamento da proteína, assistem-se a perdas significativas de transferrina ao longo do processo ao contrário do que se verifica na filtração (não se detectou a presença de proteína nos eluídos).

Adicionalmente, a amostra de transferrina resultante da precipitação necessita ainda de ser sujeita a passos adicionais de purificação no sentido da total remoção do sulfato de amónio remanescente (por exemplo, recorrendo a uma coluna de dessalinização) enquanto o ideal consiste no menor número de passos de purificação possível. Deve-se ainda acrescentar que a membrana vertical do *Vivacell 250* constitui uma vantagem adicional quando comparado com outros mecanismos de purificação semelhantes (como o *Diaflow*) ao permitir uma maior área de contacto tornando a filtração mais rápida e contribuindo para a conservação da proteína (ao fim de muito tempo a 4 °C, o N-TSH exibe sinais de degradação).

Assim, prosseguiram-se os estudos apenas com o N-TSH purificado através da filtração no *Vivacell 250*, sendo necessário determinar qual o próximo passo de purificação capaz de eliminar as impurezas ainda presentes. Com o recurso à ferramenta bio-informática ProtParam do portal ExPASy, foi possível verificar que o ponto isoeléctrico (de sigla pI) teórico do lóbulo N-terminal da transferrina é igual a 6.74; como a proteína se encontra no tampão de 10 mM Tris-HCl a um pH de 8.0 (ou seja, o pH é maior que o pI), significa que se encontra desprotonada apresentando uma carga negativa.

Consequentemente, torna-se possível recorrer à cromatografia de troca iónica na purificação da transferrina; neste caso de troca aniónica, ao fazer passar a amostra proteica numa coluna carregada positivamente (coluna Mono Q), espera-se que o N-TSH (carregado negativamente) fique retido na coluna sendo recuperada pelo aumento da força iónica do tampão de eluição (gradiente do tampão 0.4 M Tris-HCl, pH=8.0) tal como referido na literatura ⁶².

Contrariamente ao esperado, o cromatograma obtido revela que o N-TSH foi eluído no início da corrida (logo ao primeiro minuto) e não durante o gradiente (Figura 4.23) o que se confirmou com a realização de um gel SDS-PAGE. Este comportamento indica que o N-TSH não se ligou à coluna sugerindo que esta se encontra saturada; procedeu-se então à lavagem da coluna com uma solução de cloreto de sódio 1 M assistindo-se à remoção de vários contaminantes e efectuou-se uma nova corrida.

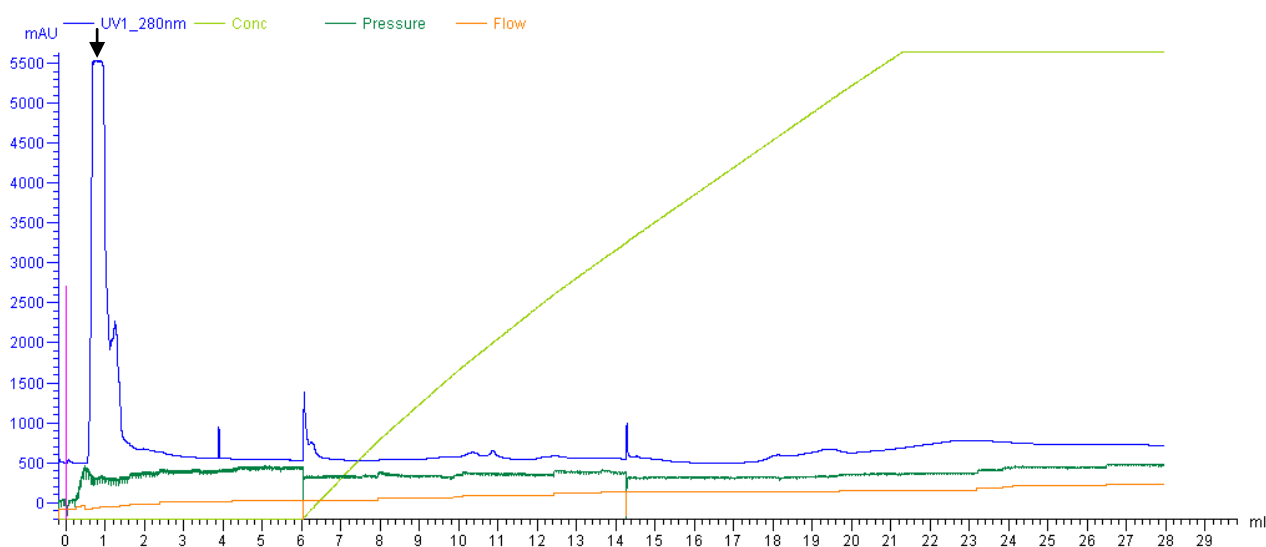


Figura 4.23 – Purificação do N-TSH por cromatografia de troca iónica antes da limpeza da coluna Mono Q. O cromatograma exibe um único pico (assinalado com uma seta preta, aproximadamente a 1 ml) correspondente à proteína (a azul) antes do início do gradiente (tampão 0.4 M Tris-HCl, pH=8.0) assinalado a verde claro

O novo cromatograma corresponde já ao esperado ao exibir dois picos característicos no gradiente tendo-se confirmado, com a realização de um gel SDS-PAGE (Figura 4.24), que os picos correspondem efectivamente à proteína ao exibirem uma banda a, aproximadamente, 37 kDa. A análise do gel permite ainda verificar que se conseguiu obter uma amostra com um elevado nível de pureza (de modo a poder comparar, aplicou-se no gel uma amostra da proteína proveniente do *Vivacell* 250) pelo que não são necessários novos passos de purificação.

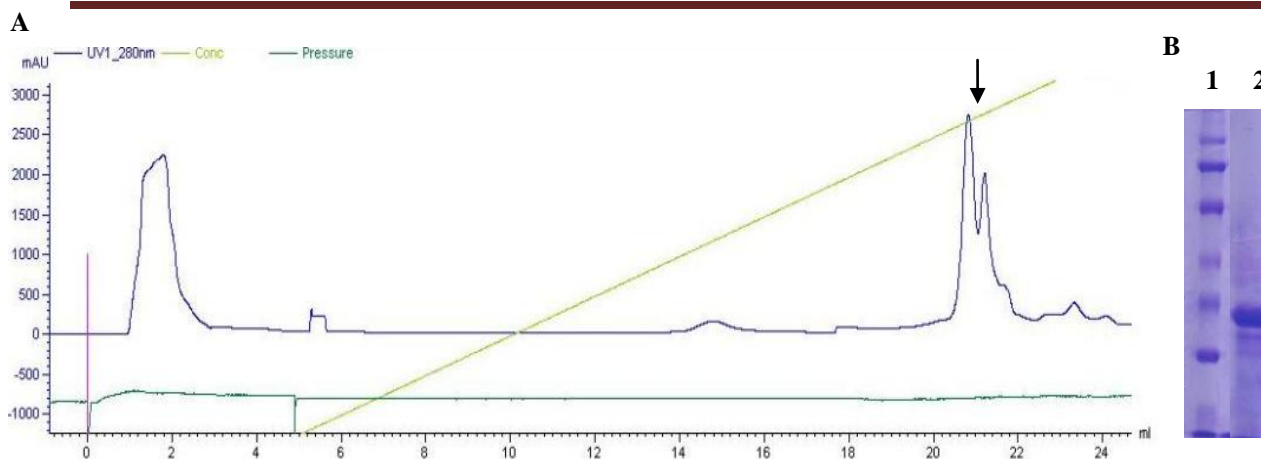


Figura 4.24 – Purificação do N-TSH por cromatografia de troca iónica após a limpeza da coluna Mono Q
A – Cromatograma do N-TSH obtido após a limpeza da coluna Mono Q. Observam-se dois picos característicos (assinalados com uma seta preta, aproximadamente a 21ml) correspondentes à proteína (a azul) antes do início do gradiente (tampão 0.4 M Tris-HCl, pH=8.0) assinalado a verde claro
B - Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com a confirmação da purificação do N-TSH após a limpeza da coluna Mono Q. O poço 1 corresponde ao marcador de pesos moleculares (de cima para baixo: 188, 123, 78, 54, 41, 27 e 19 kDa) enquanto o poço 2 corresponde aos picos (21 ml) do cromatograma

Seguindo os dados da literatura ⁷⁰, o N-TSH deve encontrar-se a 80 mg/ml para os ensaios de cristalização pelo que se procedeu à sua concentração em *centricons* com uma membrana de 10 kDa que, de modo semelhante ao mencionado para o *Vivacell 250*, permite obter o volume no qual se verifica a concentração pretendida.

A determinação da concentração foi conseguida através da leitura da absorvância do N-TSH a 280 nm e aplicação da lei de Lambert-Beer sendo que o valor do coeficiente de extinção molar (36870 M⁻¹ cm⁻¹) foi obtido através da ferramenta ProtParam:

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Em que Abs corresponde à absorvância, ϵ ao coeficiente de extinção molar, l à largura da célula de leitura (1 cm) e C à concentração da proteína.

Sabendo o peso molecular da proteína (de acordo com a ferramenta ProtParam, 36947 Da), multiplicando-o pelo valor da concentração molar (mol/dm³), foi possível determinar a respectiva concentração mássica (mg/ml) tendo-se conseguido concentrar o N-TSH até aos valores pretendidos.

De modo a comprovar a influência do grau de pureza da proteína nos ensaios de cristalização, procedeu-se à concentração de duas amostras distintas: antes e depois da purificação por troca iónica. Realizaram-se duas electroforeses SDS-PAGE para confirmar os resultados da concentração.

Usaram-se as condições de cristalização descritas na Tabela 4.13 para testar as duas amostras de N-TSH. Verificou-se que somente a amostra não sujeita à troca iónica (apenas purificada no *Vivacell 250*) originou resultados (gotas de cristalização com possíveis cristais e precipitado) já que a totalidade das gotas de cristalização da amostra purificada por troca iónica permaneceram totalmente límpidas.

A análise do gel SDS-PAGE correspondente à amostra de N-TSH antes da cromatografia de troca iónica (Figura 4.25) revela que as impurezas são pouco significativas quando comparadas com o N-TSH parecendo pouco provável que os resultados de cristalização obtidos se devam unicamente às mesmas. É, pois, possível que as impurezas presentes na amostra não sujeita à troca iónica contribuam para a cristalização da proteína (por exemplo, podem servir como pontos de nucleação) pelo que se optou por, nos ensaios de cristalização subsequentes, eliminar a cromatografia de troca iónica e concentrar as amostras de proteína provenientes da filtração no *Vivacell* 250.

Em conclusão, os métodos empregues na sobre-expressão e na purificação do N-TSH foram eficazes na obtenção da proteína pelo que se pode passar à próxima etapa do trabalho experimental e proceder aos ensaios de cristalização.

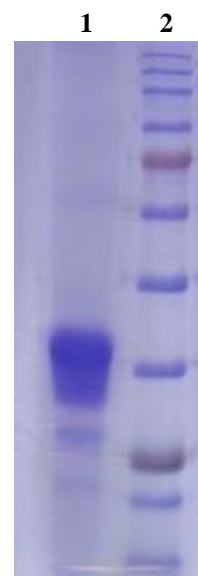


Figura 4.25 – Gel de electroforese SDS-PAGE 10% com os resultados do N-TSH não sujeito a troca iónica
1 – Amostra de N-TSH; 2 – Marcador de pesos moleculares (de cima para baixo): 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20 e 17 kDa;

4.4.2 – Ensaios de cristalização

Ensaio prévios com as soluções 80! (condições adaptadas do método de Jancarik & Kim de 1991) mostraram a capacidade de cristalização por parte do N-TSH nas condições indicadas na Tabela 4.13 pelo que se procedeu à sua reprodução: temperatura de 20 °C, proteína a 80 mg/ml e método de difusão de vapor – gota suspensa (*hanging drop*) – usando 2 µl de proteína e 2 µl de solução precipitante.

Tabela 4.13 – Condições, tipo de gota e temperatura de cristalização do *screen* 80! onde se observou a formação de cristais de transferrina

MES – Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico; HEPES – (4- (2-hidroxietil) - ácido 1-piperazinoetanosulfónico); MPD – 2-metil-2,4-pentadiol;

Concentração e tampão da Transferrina	Condições de cristalização	Tipo de gota	Temperatura de cristalização
≈ 80 mg/ml Tampão Tris-HCl 10 mM pH=8.0	14! 0.2 M Cloreto de magnésio; 0.1 M MES pH=6.5; 30% PEG 8K	Gota suspensa 2 µl + 2 µl	20 °C
	33! 0.2 M Cloreto de magnésio; 0.1 M HEPES pH=7.5; 30% Etanol		
	59! 0.2 M Acetato de magnésio; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 30% MPD		
	73! 0.2 M Formato de magnésio		

Conseguiram-se obter cristais unicamente para a condição 33! localizados em zonas de precipitado. Trata-se de cristais incolores e que, embora de pequenas dimensões (cerca de 0.05 mm), parecem ser únicos e potencialmente úteis para as experiências de difracção pelo que seria vantajoso conseguir cristais de maiores dimensões.

Consequentemente, procedeu-se à optimização da condição através da manipulação de vários parâmetros: variação da proporção da gota (2 µl de proteína e 3 µl de solução precipitante e 2 µl de proteína e 4 µl de solução precipitante), variação da concentração do agente precipitante (no caso, de 22% a 32% de etanol), variação de temperatura (4 °C e 20 °C) e variação do agente precipitante (etanol substituído por isopropanol e por butanol).

Apenas se conseguiu uma ligeira melhoria nas gotas 2 µl + 4 µl (mantendo a condição de 0.2 M de cloreto de magnésio, 0.1 M de HEPES pH=7.5 e 30% de etanol) embora o tamanho dos cristais continue a ser inferior a 0.1 mm (Figura 4.26). Ainda assim, resolveu-se utilizar estes cristais numa experiência de *soaking* com o ALF 190 durante 24 horas ao fim das quais se recolheram e congelaram em azoto líquido os melhores cristais para posterior análise por radiação de Sincrotrão no ESRF (usando-se paratona como solução crio-protectora).

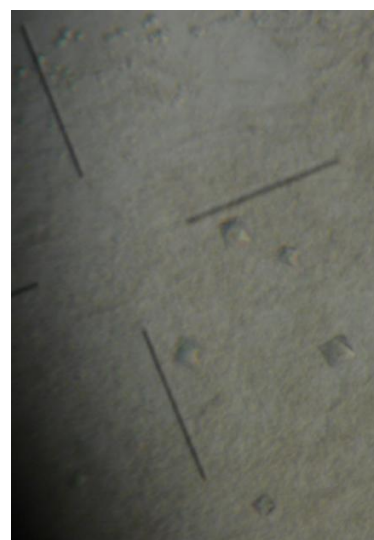


Figura 4.26 – Cristais de transferrina obtidos nos ensaios de gota suspensa
Cristais obtidos com 0.2 M de cloreto de magnésio, 0.1 M de HEPES pH=7.5 e 30% de etanol e com um tamanho de, aproximadamente, 0.07 mm

Contudo, a presença de etanol dificulta o *soaking* e a manipulação dos cristais levando à sua degradação. Como tal, foi necessário encontrar novas condições de cristalização através de ensaios de *screening*. Escolheram-se os *screens* de cristalização PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K e JBS3 para a realização de ensaios: utilização do robô de cristalização (conseguindo testar um grande número de condições com um pequeno gasto de proteína), concentração da proteína a aproximadamente 80 mg/ml e temperatura de 20 °C.

Na Tabela 4.14, indicam-se as condições em que se verificou a formação de cristais: incolores, de arestas bem definidas e com um tamanho considerável (cerca de 0.1 mm) adequado à sua manipulação nos passos posteriores (Figura 4.27).

Tabela 4.14 – Condições, tipo de gota e temperatura de cristalização dos *screens* PEG/Ion 4K, PEG/Ion 8K e JBS3 onde se observou a formação de cristais de transferrina

Screen de cristalização	Condição de cristalização	Concentração e tampão da Transferrina	Temperatura
PEG/Ion 4K (14)	20% PEG 4K; 0.2 M Tiocianato de potássio	83 mg/ml Tampão Tris-HCl 10 mM pH=8.0	20 °C
PEG/Ion 4K (20)	20% PEG 4K; 0.2 M Formato de magnésio		
PEG/Ion 4K (30)	20% PEG 4K; 0.2 M Acetato de amónio		
PEG/Ion 4K (38)	20% PEG 4K; 0.2 M Tartarato de amónio		
PEG/Ion 8K (9)	20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de amónio		
PEG/Ion 8K (35)	20% PEG 8K; 0.2 M Sulfato de amónio		
PEG/Ion 8K (40)	20% PEG 8K; 0.2 M Fosfato hidrogénio di-sódio		
PEG/Ion 8K (42)	20% PEG 8K; 0.2 M Fosfato hidrogénio di-potássio		
JBS3 (63)	22% PEG 4K; 0.2 M Sulfato de amónio; 0.1 M Acetato de sódio		

Deste modo, realizaram-se novos ensaios com as condições presentes na Tabela 4.14 para tentar a co-cristalização do N-TSH com diferentes compostos (ALF 190, ALF 475 e ALF 486). Realce-se que se optou pela co-cristalização (incubação do N-TSH com o composto antes da realização das placas) em detrimento do *soaking* devido ao reduzido volume da gota de robô (0.5 µl).

Verificaram-se as placas ao fim de 72 horas, observando-se a formação de alguns cristais de qualidade (únicos e com tamanho aproximado de 0.1 mm) principalmente no caso do ALF 475. Procedeu-se posteriormente à recolha e ao congelamento em azoto líquido dos melhores cristais (usando paratona como solução de crio-protecção) para posterior análise por radiação de Sincrotrão no ESRF (Grenoble, França). Na Tabela 4.15, encontram-se resumidas as condições observadas para os cristais analisados (tanto os cristais nos quais se realizou *soaking* como os obtidos por co-cristalização).

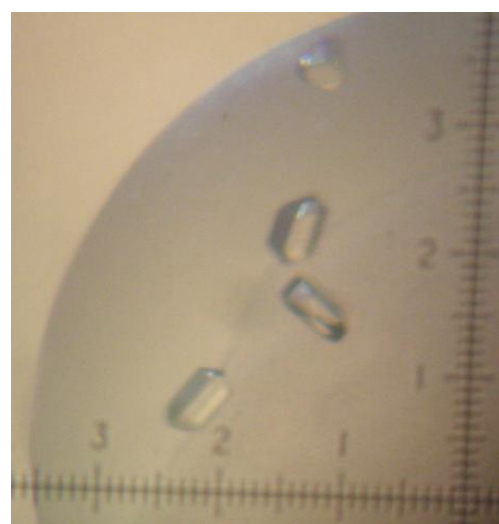


Figura 4.27 – Cristais de transferrina obtidos nos ensaios de *screening*
Cristais obtidos com 20% PEG 8K e 0.2 M Fosfato hidrogénio di-potássio e com um tamanho de, aproximadamente, 0.1 mm

Tabela 4.15 – Resumo das condições e resultados de difracção dos cristais de transferrina analisados por radiação de Sincrotrão (ESRF)

Concentração e tampão da Transferrina	Soaking com	Co-cristalização com	Condições de cristalização	Linha de Sincrotrão	Resultado de difracção
80 mg/ml Tampão Tris-HCl 10 mM pH=8.0	ALF 190	–	33!	ID 14-1 ESRF	Não difractou
	ALF 190	–	0.2 M Cloreto de magnésio; 0.1 M HEPES pH=7.5; 30% Etanol		
	ALF 190	–			
83 mg/ml Tampão Tris-HCl 10 mM pH=8.0	–	ALF 475	PEG/Ion 4K (20) 20% PEG 4K; 0.2 M Formato de magnésio	ID 14-4 ESRF	Sal
	–	ALF 475	PEG/Ion 4K (38) 20% PEG 4K; 0.2 M Tartarato de amónio	ID 14-4 ESRF	Sal
	–	ALF 475	PEG/Ion 8K (40) 20% PEG 8K; 0.2 M Fosfato hidrogénio di-sódio	ID 14-4 ESRF	Não difractou
	–	ALF 475	PEG/Ion 8K (42)	ID 14-1 ESRF	Sal
	–	ALF 475	20% PEG 8K; 0.2 M Fosfato hidrogénio di-potássio	ID 14-1 ESRF	Sal
	–	ALF 475	JBS3 (63) 22% PEG 4K; 0.2 M Sulfato de amónio; 0.1 M Acetato de sódio	ID 14-4 ESRF	Não difractou
	–	ALF 486	PEG/Ion 8K (40) 20% PEG 8K; 0.2 M Fosfato hidrogénio di-sódio	ID 14-4 ESRF	Não difractou

A análise dos resultados apresentados na Tabela 4.15 revela que não se conseguiu obter dados de difracção de nenhum dos cristais testados: ou não difractaram de todo ou eram sal (tal como no caso da albumina, o facto dos cristais de transferrina serem incolores torna mais difícil a sua distinção de cristais de sal).

Observa-se igualmente que as condições responsáveis pelo surgimento de cristais de sal pertencem aos *screens* PEG/Ion 4K e PEG/Ion 8K usados na determinação de novas condições de cristalização. Para tentar concluir acerca da origem de cristais não proteicos, repetiram-se os ensaios com as mesmas condições, mas usando água em substituição da proteína. Passadas 24 horas, observaram-se cristais nas gotas preparadas confirmando-se a tendência dos fosfatos e dos sais amónio cristalizarem com frequência. É, pois, possível constatar que os *screens* PEG/Ion (4K e 8K) parecem não ser adequados para a cristalização da transferrina já que as condições, aparentemente utilizáveis na obtenção de cristais de proteína, são, na realidade, propícias à formação de cristais de sal.

Por outro lado, com as restantes condições analisadas, obtiveram-se cristais que não difractaram pelo que é necessário prosseguir com os ensaios de cristalização de modo a conseguir-se encontrar condições de obtenção de cristais de transferrina. Para tal, deve-se começar por realizar novamente testes de *screening* com diferentes *screens* de cristalização de modo a contemplar novas condições de cristalização podendo-se, desde logo, experimentar a 4 °C e a 20 °C de modo a avaliar o efeito da temperatura.

Conforme mencionado anteriormente, mesmo sem recorrer à cromatografia de troca iónica, a análise dos géis SDS-PAGE indica que se consegue obter transferrina pura o suficiente para os ensaios de cristalização pelo que os métodos de expressão e purificação devem ser mantidos. Pode-se, todavia, tentar variar a concentração de transferrina já que nos ensaios de cristalização efectuados se verificaram gotas límpidas e gotas com grandes quantidades de precipitado o que pode indicar, respectivamente, a deficiência ou o excesso de proteína que não permite atingir a zona metaestável e conseguir a sua cristalização.

É ainda possível que o tampão no qual se mantém a transferrina (tampão Tris-HCl, pH=8.0) não ajude a estabilizar a proteína e, deste modo, dificulte a cristalização pelo que se pode recorrer à mudança de tampão antes dos ensaios de cristalização e verificar se os resultados obtidos melhoram.

Espera-se que, seguindo os passos anteriores, se consigam condições favoráveis à formação de cristais que, mesmo não sendo ainda utilizáveis, possam ser alvo de optimização. Simultaneamente, estes cristais podem ainda ser aproveitados para futuros ensaios de *seeding*.

Em conclusão, não foi possível determinar condições de cristalização para a transferrina inviabilizando o estudo das interacções entre a proteína e vários ALFs e a caracterização de possíveis aductos proteína-composto. Deste modo, é ainda necessário estabelecer condições que permitam a obtenção de cristais satisfatórios para o desenrolar das pesquisas relacionadas com os ALFs e que contribuam para uma melhor compreensão dos mesmos.

5. – Conclusão e perspectivas futuras

Nas últimas décadas, assistiu-se a um extraordinário desenvolvimento dos conhecimentos relativos ao monóxido de carbono que permitiu passar de uma visão redutora do CO como uma simples substância tóxica para uma perspectiva mais realista e que contempla possíveis efeitos benéficos desta molécula gasosa.

De facto, a descoberta da produção endógena do CO pela oxigenase do hemo permitiu ultrapassar o tradicional conceito da toxicidade do CO sendo que o desenrolar dos vários estudos sobre a presente temática conseguiu ainda comprovar a existência de efeitos biológicos por parte desta pequena molécula. Como seria de esperar, a descoberta destes efeitos levantou a hipótese da existência de efeitos terapêuticos conseguindo-se resultados prometedores quanto ao uso do CO no combate a determinadas patologias.

É neste contexto que os CORMs, ou seja, compostos capazes de libertar moléculas de CO, emergem como uma possível solução para a aplicação do monóxido de carbono *in vivo*. Todavia, e apesar de muito se ter já desvendado, muito mais se encontra ainda por esclarecer; vários CORMs têm vindo a ser desenvolvidos, mas a maioria não reúne as condições necessárias para avançar até à etapa dos testes clínicos.

Porventura o factor decisivo no uso dos CORMs como fármacos prende-se com a respectiva farmacocinética *in vivo* largamente determinada pelas interacções estabelecidas com diversas proteínas sanguíneas como a hemoglobina, a albumina e a transferrina.

Assim, o trabalho desenvolvido no âmbito da presente Dissertação procurou essencialmente caracterizar tais interacções de modo a revelar os mecanismos de libertação do CO e de transporte dos CORMs ao longo da corrente sanguínea através de técnicas de Espectroscopia e, principalmente, por Cristalografia de Raios-X (técnica importante na determinação da estrutura tridimensional de proteínas).

Por um lado, com a lisozima (incluída nos estudos pela facilidade de cristalização) e com a hemoglobina, conhecendo-se já condições de cristalização, procurou-se fundamentalmente o *soaking* com vários compostos da empresa Alfama de modo a estudar as possíveis interacções. Por outro lado, com a albumina e com a transferrina, teve-se como objectivo primordial o estabelecimento de condições de cristalização que permitirão, posteriormente, proceder à realização dos ensaios de interacção entre os compostos e as proteínas.

Os estudos realizados com a lisozima permitiram a obtenção de cristais de qualidade usados na interacção com diferentes compostos através da técnica de *soaking*. Por Cristalografia de Raios-X, conseguiu-se resolver e refinar com sucesso a estrutura tridimensional da lisozima com o ALF 850 tendo-se verificado a existência de quatro locais diferentes para a ligação do ruténio do ALF 850 à proteína: Histidina 15, Aspartato 18, Aspartato 101 e Aspartato 119. Contudo, os dados obtidos apenas permitiram caracterizar de modo preliminar o aducto formado com a Histidina 15 sendo visível a presença de apenas uma molécula de CO face às três moléculas existentes inicialmente no composto.

A estrutura obtida permite comprovar a existência de perdas de CO (duas moléculas) por parte do composto o que, por sua vez, comprova o seu potencial farmacológico.

Deste modo, pretende-se futuramente finalizar o estudo sistemático das interacções do ALF 850 pela caracterização dos restantes três locais de ligação do ruténio e, paralelamente, pela obtenção de dados indicativos da formação de aductos por Espectroscopia de Infra-vermelhos. Após se conseguir elucidar, por completo, os aductos formados entre o ALF 850 e a lisozima, pretende-se efectuar estudos semelhantes envolvendo novos compostos; sendo o modelo por excelência nos estudos por Cristalografia, espera-se que a determinação das interacções dos compostos com a lisozima esteja na base da compreensão do seu funcionamento e que permita a passagem para os estudos com as proteínas plasmáticas.

Nos estudos realizados com a hemoglobina, além das técnicas já citadas, empregou-se ainda a Espectroscopia Ultra-violeta/Visível capaz de detectar a ligação do CO à proteína. Testaram-se vários compostos sendo que, por Espectroscopia de Infra-vermelhos, o ALF 850 mostrou a capacidade de formação de aductos com a hemoglobina. De igual forma, obtiveram-se cristais de hemoglobina usados no *soaking* com o mesmo composto, mas, por Cristalografia de Raios-X, foi possível concluir que o ALF 850 não se incorporou com sucesso no cristal e, consequentemente, tornou-se impossível proceder à caracterização estrutural dos aductos.

Atendendo aos resultados promissores obtidos com o ALF 850, o principal objectivo no futuro passa por conseguir analisar estruturalmente os eventuais aductos formados com a hemoglobina que, como verificado com a lisozima, mostrem o potencial terapêutico do composto. Em simultâneo, de modo a conseguir-se o máximo de informação, pretende-se repetir os estudos por Espectroscopia para confirmar os resultados estruturais.

Já no caso da albumina, apesar das várias condições de cristalização testadas, não se conseguiu obter cristais de proteína pelo que não foi possível prosseguir com os estudos envolvendo os compostos. Neste sentido, ter-se-á que, através dos métodos discutidos previamente, tentar obter cristais de qualidade já que, atendendo ao importante papel da albumina no transporte de moléculas ao longo da corrente sanguínea, a compreensão das interacções entre os compostos e a proteína se torna fulcral para a sua utilização como fármacos.

Por último, com a transferrina, conseguiu-se otimizar o processo de sobre-expressão do lóbulo N-terminal em *Pichia pastoris* e a respectiva purificação para os ensaios de cristalização. Contudo, tal como com a albumina, não se obtiveram cristais de proteína sendo necessário prosseguir os estudos para encontrar condições de cristalização de acordo com o descrito anteriormente e, deste modo, analisar o comportamento dos compostos com a proteína.

Assim, embora não se tenham alcançado todos os objectivos propostos inicialmente, o trabalho desenvolvido permitiu a obtenção de novos dados sobre as interacções estabelecidas entre o ALF 850 e as proteínas de interesse constituindo um importante ponto de partida para a completa caracterização do composto; numa outra perspectiva, espera-se ainda que estes mesmos dados ajudem

na futura interpretação de novos resultados obtidos para diferentes compostos. Este facto ganha maior importância se se pensar que, apesar de todas as pesquisas envolvendo os CORMs, a caracterização estrutural dos aductos entre tais compostos e as proteínas sanguíneas se encontra ainda nas suas etapas iniciais.

Em conclusão, além de ser um exemplo da estreita colaboração que pode existir entre a investigação fundamental e a indústria, o presente projecto conseguiu contribuir para o avançar dos conhecimentos disponíveis sobre esta vasta área de investigação e, deste modo, ajudar a promover a futura utilização deste tipo de compostos na elaboração de fármacos viáveis e seguros empregues no combate a diversas doenças que ainda hoje afectam largos milhões de pessoas em todo o planeta.

6. – Bibliografia

1. Ryter, S. W.; Otterbein, L. E., Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* **2004**, 26 (3), 270-280.
2. Otterbein, L. E., The Evolution of Carbon Monoxide Into Medicine. *Respiratory Care* **2009**, 54 (7), 925-932.
3. Ryter, S. W.; Alam, J.; Choi, A. M. K., Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews* **2006**, 86 (2), 583-650.
4. Bauer, I.; Pannen, B., Bench-to-bedside review: Carbon monoxide - from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Critical Care* **2009**, 13 (4), 220.
5. Wu, L.; Wang, R., Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. *Pharmacological Reviews* **2005**, 57 (4), 585-630.
6. Foresti, R.; Bani-Hani, M.; Motterlini, R., Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Medicine* **2008**, 34 (4), 649-658.
7. Mannaioni, P.; Vannacci, A.; Masini, E., Carbon monoxide: the bad and the good side of the coin, from neuronal death to anti-inflammatory activity. *Inflammation Research* **2006**, 55 (7), 261-273.
8. Miyakawa, S.; Yamanashi, H.; Kobayashi, K.; Cleaves, H. J.; Miller, S. L., Prebiotic synthesis from CO atmospheres: Implications for the origins of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99 (23), 14628-14631.
9. Dulak, J.; Jozkowicz, A., Carbon monoxide - a "new" gaseous modulator of gene expression. *Acta biochimica Polonica* **2003**, 50 (1), 31-47.
10. Stevenson, D. K.; Vream, H. J.; Wong, R. J.; Dennery, P. A.; Contag, C. H., Carbon Monoxide Detection and Biological Investigations. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **2000**, 111, 61-75.
11. Motterlini, R.; Otterbein, L. E., The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9 (9), 728-743.
12. Gibbons, S. J.; Farrugia, G., The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *The Journal of Physiology* **2004**, 556 (2), 325-336.
13. Idriss, N. K.; Blann, A. D.; Lip, G. Y. H., Hemoxygenase-1 in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* **2008**, 52 (12), 971-978.
14. Ryter, S. W.; Otterbein, L. E.; Morse, D.; Choi, A. M. K., Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: Regulation and functional significance. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2002**, 234-235 (1), 249-263.
15. Maines, M. D., THE HEME OXYGENASE SYSTEM: A Regulator of Second Messenger Gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **1997**, 37 (1), 517-554.
16. Sugishima, M.; Omata, Y.; Kakuta, Y.; Sakamoto, H.; Noguchi, M.; Fukuyama, K., Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme. *FEBS letters* **2000**, 471 (1), 61-66.
17. Kikuchi, G.; Yoshida, T.; Noguchi, M., Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 338 (1), 558-567.

18. Bianchetti, C. M.; Yi, L.; Ragsdale, S. W.; Phillips, G. N., Comparison of Apo- and Heme-bound Crystal Structures of a Truncated Human Heme Oxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282 (52), 37624-37631.
19. Vera, T.; Stec, D. E., Heme Oxygenase-1: A Potential Antihypertensive Target. *Current Hypertension Reviews* **2007**, 3 (1), 75-82.
20. Kim, Y.-M.; Pae, H.-O.; Park, J. E.; Lee, Y. C.; Woo, J. M.; Kim, N.-H.; Choi, Y. K.; Lee, B.-S.; Kim, S. R.; Chung, H.-T., Heme Oxygenase in the Regulation of Vascular Biology: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, 14 (1), 137-167.
21. Piantadosi, C. A., Carbon monoxide, reactive oxygen signaling, and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, 45 (5), 562-569.
22. Bloch, K. D.; Ichinose, F.; Roberts, J. D.; Zapol, W. M., Inhaled NO as a therapeutic agent. *Cardiovascular Research* **2007**, 75 (2), 339-348.
23. Szabo, C., Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6 (11), 917-935.
24. Cary, S. P. L.; Marletta, M. A., The case of CO signaling: why the jury is still out. *The Journal of Clinical Investigation* **2001**, 107 (9), 1071-1073.
25. Kim, H. P.; Ryter, S. W.; Choi, A. M. K., CO as a cellular signaling molecule. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2006**, 46 (1), 411-449.
26. Ledoux, J.; Werner, M. E.; Brayden, J. E.; Nelson, M. T., Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* **2006**, 21 (1), 69-78.
27. Ryter, S. W.; Morse, D.; Choi, A. M. K., Carbon Monoxide and Bilirubin: Potential Therapies for Pulmonary/Vascular Injury and Disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2007**, 36 (2), 175-182.
28. Bilban, M.; Haschemi, A.; Wegiel, B.; Chin, B.; Wagner, O.; Otterbein, L., Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *Journal of Molecular Medicine* **2008**, 86 (3), 267-279.
29. Sato, K.; Balla, J.; Otterbein, L.; Smith, R. N.; Brouard, S.; Lin, Y.; Csizmadia, E.; Seigny, J.; Robson, S. C.; Vercellotti, G.; Choi, A. M.; Bach, F. H.; Soares, M. P., Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase-1 Suppresses the Rejection of Mouse-to-Rat Cardiac Transplants. *The Journal of Immunology* **2001**, 166 (6), 4185-4194.
30. Nakao, A.; Choi, A. M. K.; Murase, N., Protective effect of carbon monoxide in transplantation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2006**, 10 (3), 650-671.
31. Wegiel, B.; Chin, B. Y.; Otterbein, L. E., Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle* **2008**, 7 (10), 1379-1384.
32. Otterbein, L. E.; Soares, M. P.; Yamashita, K.; Bach, F. H., Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology* **2003**, 24 (8), 449-455.
33. Szabo, C., Gaseotransmitters: New Frontiers for Translational Science. *Science Translational Medicine* **2010**, 2 (59), 59ps54.

34. Motterlini, R.; Mann, B. E.; Foresti, R., Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2005**, *14* (11), 1305-1318.
35. Santos-Silva, T.; Mukhopadhyay, A.; Seixas, J. D.; Bernardes, G. J. L.; Romão, C. C.; Romão, M. J., Towards Improved Therapeutic CORMs: Understanding the Reactivity of CORM-3 with proteins. *Current Medicinal Chemistry* **2011**.
36. Foresti, R.; Motterlini, R., Interaction of carbon monoxide with transition metals: evolutionary insights into drug target discovery. *CDT* **2010**, *11* (12), 1595-1604.
37. Johnson, T. R.; Mann, B. E.; Clark, J. E.; Foresti, R.; Green, C. J.; Motterlini, R., Metal Carbonyls: A New Class of Pharmaceuticals? *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (32), 3722-3729.
38. Alberto, R.; Motterlini, R., Chemistry and biological activities of CO-releasing molecules (CORMs) and transition metal complexes. *Dalton Transactions* **2007**, (17), 1651-1660.
39. Motterlini, R., Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochemical Society Transactions* **2007**, *35* (5), 1142-1146.
40. Motterlini, R.; Clark, J. E.; Foresti, R.; Sarathchandra, P.; Mann, B. E.; Green, C. J., Carbon Monoxide-Releasing Molecules. *Circulation Research* **2002**, *90* (2), e17-e24.
41. Sawle, P.; Foresti, R.; Mann, B. E.; Johnson, T. R.; Green, C. J.; Motterlini, R., Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *British Journal of Pharmacology* **2005**, *145* (6), 800-810.
42. Wei, Y.; Chen, P.; de Bruyn, M.; Zhang, W.; Bremer, E.; Helfrich, W., Carbon Monoxide-Releasing Molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterology* **2010**, *10* (1), 42.
43. Clark, J. E.; Naughton, P.; Shurey, S.; Green, C. J.; Johnson, T. R.; Mann, B. E.; Foresti, R.; Motterlini, R., Cardioprotective Actions by a Water-Soluble Carbon Monoxide-Releasing Molecule. *Circulation Research* **2003**, *93* (2), e2-e8.
44. Motterlini, R.; Sawle, P.; Bains, S.; Hammad, J.; Alberto, R.; Foresti, R.; Green, C. J., CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *The FASEB Journal* **2004**, 284-286.
45. Gonzalez, M. A.; Fry, N. L.; Burt, R.; Davda, R.; Hobbs, A.; Mascharak, P. K., Designed Iron Carbonyls as Carbon Monoxide (CO) Releasing Molecules: Rapid CO Release and Delivery to Myoglobin in Aqueous Buffer, and Vasorelaxation of Mouse Aorta. *Inorganic Chemistry* **2011**, *50* (7), 3127-3134.
46. Bikiel, D. E.; González Solveyra, E.; Di Salvo, F.; Milagre, H. M. S.; Eberlin, M. N.; Corrêa, R. S.; Ellena, J.; Estrin, D. A.; Doctorovich, F., Tetrachlorocarbonyliridates: Water-Soluble Carbon Monoxide Releasing Molecules Rate-Modulated by the Sixth Ligand. *Inorganic Chemistry* **2011**, *50* (6), 2334-2345.
47. Kretschmer, R.; Gessner, G.; Görls, H.; Heinemann, S. H.; Westerhausen, M., Dicarboxyl-bis(cysteamine)iron(II): A light induced carbon monoxide releasing molecule based on iron (CORM-S1). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, *105* (1), 6-9.

48. Seixas, J. D., Development of CO-Releasing Molecules for the Treatment of Inflammatory Diseases. Ph. D. Dissertation, ITQB-UNL, Oeiras, **2011**.
49. Caldwell, J.; Gardner, I.; Swales, N., An Introduction to Drug Disposition: The Basic Principles of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. *Toxicologic Pathology* **1995**, *23* (2), 102-114.
50. Santos-Silva, T.; Mukhopadhyay, A.; Seixas, J. D.; Bernardes, G. J. L.; Romão, C.C.; Romão, M. J., CORM-3 Reactivity toward Proteins: The Crystal Structure of a Ru(II) Dicarbonyl-Lysozyme Complex. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (5), 1192-1195.
51. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> - Consultado a 6 de Setembro de 2011
52. Romão, M. J., Cristalografia de Proteínas: metodologias e aplicações em Bioquímica. *Boletim de Biotecnologia* **1996**, *53* -, 18-36.
53. Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M., Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS Journal* **2008**, *275* (1), 1-21.
54. Gale, R., *Crystallography Made Crystal Clear - A Guide for Users of Macromolecular Models - Third edition*. Academic Press: 2006; pp. 7-177.
55. Carvalho, A. L.; Trincão, J.; Romão, M. J., X-Ray Crystallography in Drug Discovery. Ligand Macromolecular Interactions. In *Drug Discovery*. Roque, A. C. A., Ed. Humana Press: 2009; Vol. 572, pp 31-56.
56. Tickle, I.; Sharff, A.; Vinkovic, M.; Yon, J.; Jhoti, H., High-throughput protein crystallography and drug discovery. *Chemical Society Reviews* **2004**, *33* (8), 558-565.
57. Li, M.; Chang, W.-r., Protein crystallization. *Photosynthesis Research* **2009**, *102* (2), 223-229.
58. Weber, P. C., [2] Overview of protein crystallization methods. In *Methods in Enzymology*, Charles W. Carter, Jr., Ed. Academic Press: 1997; Vol. 276, pp 13-22.
59. Chayen, N. E.; Saridakis, E., Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Meth* **2008**, *5* (2), 147-153.
60. Fleming, A., On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **1922**, *93* (653), 306-317.
61. Callewaert, L.; Michiels, C. W., Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* **2010**, *35* (1), 127-160.
62. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry - Sixth edition*. W. H. Freeman and Company: 2007; pp. 183-188.
63. Curry, S., Lessons from the Crystallographic Analysis of Small Molecule Binding to Human Serum Albumin. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2009**, *24* (4), 342-357.
64. Evans, T. W., Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2002**, *16*, 6-11.

65. Baker, H. M.; Anderson, B. F.; Baker, E. N., Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (7), 3579-3583.
66. Mason, A. B.; Woodworth, R. C.; Oliver, R. W. A.; Green, B. N.; Lin, L.-N.; Brandts, J. F.; Tam, B. M.; Maxwell, A.; MacGillivray, R. T. A., Production and Isolation of the Recombinant N-Lobe of Human Serum Transferrin from the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **1996**, *8* (1), 119-125.
67. Vaney, M. C.; Maignan, S.; Ries-Kautt, M.; Ducruix, A., High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. *Acta Crystallographica Section D* **1996**, *52* (3), 505-517.
68. Zwart, A.; Buursma, A.; van Kampen, E. J.; Zijlstra, W. G., Multicomponent analysis of hemoglobin derivatives with reversed-optics spectrophotometer. *Clinical Chemistry* **1984**, *30* (3), 373-379.
69. Aranda, R.; Cai, H.; Worley, C. E.; Levin, E. J.; Li, R.; Olson, J. S.; Phillips, G. N.; Richards, M. P., Structural analysis of fish versus mammalian hemoglobins: Effect of the heme pocket environment on autooxidation and heme loss. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2009**, *75* (1), 217-230.
70. Bewley, M. C.; Tam, B. M.; Grewal, J.; He, S.; Shewry, S.; Murphy, M. E. P.; Mason, A. B.; Woodworth, R. C.; Baker, E. N.; MacGillivray, R. T. A., X-ray Crystallography and Mass Spectroscopy Reveal that the N-lobe of Human Transferrin Expressed in *Pichia pastoris* Is Folded Correctly but Is Glycosylated on Serine-32[†],[‡]. *Biochemistry* **1999**, *38* (8), 2535-2541.

7. – Anexos

7.1 – *Screen* de cristalização JBS1

JBS1 (1) – 15% PEG 400; 100 mM Acetato de sódio pH=4.5; 100 mM Cloreto de cálcio

JBS1 (2) – 15% PEG 400; 100 mM MES pH=6.5

JBS1 (3) – 15% PEG 400; 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Cloreto de magnésio

JBS1 (4) – 15% PEG 400, 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Citrato de sódio

JBS1 (5) – 25% PEG 400; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6; 100 mM Cloreto de magnésio

JBS1 (6) – 25% PEG 400; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Sulfato de lítio

JBS1 (7) – 28% PEG 400, 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Cloreto de cálcio

JBS1 (8) – 30% PEG 400; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6; 100 mM Cloreto de cálcio

JBS1 (9) – 30% PEG 400; 100 mM MES pH=6.5; 100 mM Acetato de sódio

JBS1 (10) – 30% PEG 400; 100 mM MES pH=6.5; 100 mM Cloreto de magnésio

JBS1 (11) – 30% PEG 400; 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Cloreto de magnésio

JBS1 (12) – 30% PEG 400; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Citrato de cálcio

JBS1 (13) – 30% PEG 550; 100 mM Bicina pH=9; 100 mM Cloreto de sódio

JBS1 (14) – 25% PEG 550; 100 mM MES pH=6.5; 10 mM Sulfato de zinco

JBS1 (15) – 25% PEG 1000; 100 mM HEPES pH=7.5

JBS1 (16) – 30% PEG 1000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5

JBS1 (17) – 15% PEG 1500

JBS1 (18) – 20% PEG 1500; 100 mM HEPES pH=7.5

JBS1 (19) – 30% PEG 1500

JBS1 (20) – 20% PEG 2000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 10 mM Cloreto de níquel (II)

JBS1 (21) – 25% PEG 200

JBS1 (22) – 30% PEG 2000; 100 mM MES pH=6.5; 100 mM Acetato de sódio

JBS1 (23) – 20% PEG 3000; 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Acetato de sódio

JBS1 (24) – 30% PEG 3000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Sulfato de lítio

7.2 – Screen de cristalização JBS2

JBS2 (1) – 4% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6

JBS2 (2) – 8% PEG 4000

JBS2 (3) – 8% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6

JBS2 (4) – 10% PEG 4000; 100 mM MES pH=6.5; 200 mM Cloreto de magnésio

JBS2 (5) – 12% PEG 4000; 100 mM HEPES pH=7.5; 100 mM Acetato de sódio

JBS2 (6) – 12% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5

JBS2 (7) – 16 % PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Sulfato de lítio

JBS2 (8) – 16 % PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Acetato de sódio

JBS2 (9) – 16 % PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Cloreto de magnésio

JBS2 (10) – 18% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6

JBS2 (11) – 20% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Sulfato de lítio

JBS2 (12) – 20% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Cloreto de cálcio

JBS2 (13) – 22% PEG 4000; 100 mM HEPES pH=7.5; 100 mM Acetato de sódio

JBS2 (14) – 25% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6

JBS2 (15) – 25% PEG 4000; 100 mM MES pH=6.5; 200 mM Cloreto de magnésio

JBS2 (16) – 25% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Cloreto de cálcio

JBS2 (17) – 30% PEG 4000

JBS2 (18) – 30% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6; 100 mM Cloreto de magnésio

JBS2 (19) – 30% PEG 4000; 100 mM MES pH=6.5

JBS2 (20) – 30% PEG 4000; 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Cloreto de cálcio

JBS2 (21) – 30% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Sulfato de lítio

JBS2 (22) – 30% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Acetato de sódio

JBS2 (23) – 30% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Cloreto de magnésio

JBS2 (24) – 35% PEG 4000

7.3 – Screen de cristalização JBS3

JBS3 (1) – 8% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 800 mM Cloreto de lítio

JBS3 (2) – 10% PEG 4000; 20% 2-Propanol

JBS3 (3) – 8% PEG 4000; 100 mM Citrato de sódio pH=5.6; 10% 2-Propanol

JBS3 (4) – 10% PEG 4000; 100 mM HEPES pH=7.5; 5% 2-Propanol

JBS3 (5) – 10% PEG 4000; 100 mM HEPES pH=7.5; 5% 2-Propanol

JBS3 (6) – 12% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (7) – 15% PEG 4000; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (8) – 15% PEG 4000; 100 mM Citrato de sódio pH=5.6; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (9) – 16% PEG 4000; 10% 2-Propanol; 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (10) – 20% PEG 4000; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (11) – 20% PEG 4000; 10% Glicerol; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (12) – 20% PEG 4000; 5% 2-Propanol; 100 mM Citrato de sódio

JBS3 (13) – 20% PEG 4000; 20% 2-Propanol; 100 mM Citrato de sódio

JBS3 (14) – 20% PEG 4000; 100 mM MES pH=6.5; 600 mM Cloreto de sódio

JBS3 (15) – 20% PEG 4000; 10% 2-Propanol; 100 mM HEPES pH=7.5

JBS3 (16) – 22% PEG 4000; 200 mM Sulfato de amónio; 100 mM Acetato de sódio

JBS3 (17) – 25% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6, 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (18) – 25% PEG 4000; 100 mM Citrato de sódio pH=5.6; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (19) – 25% PEG 4000; 100 mM HEPES pH=7.5; 100 mM Acetato de sódio; 200 mM Sulfato de lítio

JBS3 (20) – 25% PEG 4000; 8% 2-Propanol; 100 mM Acetato de sódio

JBS3 (21) – 30% PEG 4000; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (22) – 30% PEG 4000; 100 mM Acetato de sódio pH=4.6; 200 mM Sulfato de amónio

JBS3 (23) – 30% PEG 4000; Citrato de sódio pH=5.6; 100 mM Sulfato de amónio

JBS3 (24) – 32% PEG 4000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 800 mM Cloreto de lítio

7.4 – Screen de cristalização JBS4

JBS4 (1) – 25% PEG 5000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 200 mM Cloreto de lítio

JBS4 (2) – 30% PEG 5000; 100 mM MES pH=6.5; 200 mM Sulfato de amónio

JBS4 (3) – 3% PEG 6000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 100 mM Cloreto de potássio

JBS4 (4) – 10% PEG 6000; 10 mM Cloreto de magnésio

JBS4 (5) – 12% PEG 6000; 2 M Cloreto de sódio

JBS4 (6) – 15% PEG 6000; 5% Glicerol

JBS4 (7) – 15% PEG 6000; 50 mM Cloreto de potássio; 10 mM Cloreto de magnésio

JBS4 (8) – 16% PEG 6000; 10 mM Citrato de sódio

JBS4 (9) – 20% PEG 6000; 50 mM Imidazol-HCl pH=8

JBS4 (10) – 25% PEG 6000; 100 mM HEPES pH=7.5; 100 mM Cloreto de lítio

JBS4 (11) – 28% PEG 6000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5; 500 mM Cloreto de lítio

JBS4 (12) – 30% PEG 6000; 5% 2-Propanol; 1 M Cloreto de lítio; 100 mM Citrato de sódio

JBS4 (13) – 33% PEG 6000; 10 mM Citrato de sódio

JBS4 (14) – 2% PEG 8000; 500 mM Cloreto de lítio

JBS4 (15) – 2% PEG 8000; 1 M Cloreto de lítio

JBS4 (16) – 4% PEG 8000

JBS4 (17) – 8% PEG 8000; 200 mM Cloreto de lítio; 50 mM Sulfato de magnésio

JBS4 (18) – 8% PEG 8000; 100 mM Tris-HCl pH=8.5

JBS4 (19) – 10% PEG 8000; 100 mM MES pH=6.5; 200 mM Acetato de zinco

JBS4 (20) – 10% PEG 8000; 100 mM HEPES pH=7.5; 200 mM Acetato de cálcio

JBS4 (21) – 10% PEG 8000; 50 mM Acetato de magnésio; 100 mM Acetato de sódio

JBS4 (22) – 10% PEG 8000; 200 mM Acetato de magnésio

JBS4 (23) – 10% PEG 8000; 10% Etilenoglicol; 100 mM HEPES pH=7.5

JBS4 (24) – 10% PEG 8000; 10% PEG 1000

7.5 – Screen de cristalização JCSG+

JCSG (1) – 50% PEG 400; 0.1 M Acetato de sódio pH=4.5; 0.2 M Sulfato de lítio

JCSG (2) – 20% PEG 3000; 0.1 M Acetato de sódio pH=5.5; 200 mM Sulfato de amónio

JCSG (3) – 30% PEG 3350; 0.2 M Citrato di-amónio hidrogénio

JCSG (4) – 30% MPD; 0.1 M Acetato de sódio pH=4.6; 0.02 M Cloreto de cálcio

JCSG (5) – 20% PEG 3350; 0.2 M Formato de magnésio

JCSG (6) – 20% PEG 1000; 0.1 M Fosfato/citrato pH=4.2; 0.2 M Sulfato de lítio

JCSG (7) – 20% PEG 8000; 0.1 M CHES pH=9.5

JCSG (8) – 20% PEG 3350; 0.2 M Formato de amónio

JCSG (9) – 20% PEG 3350; 0.2 M Cloreto de amónio

JCSG (10) – 20% PEG 3350; 0.2 M Formato de potássio

JCSG (11) – 50% MPD; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Fosfato dihidrogénio de amónio

JCSG (12) – 20% PEG 3350; 0.2 M Nitrato de potássio

JCSG (13) – 0.1 M Citrato pH=4; 0.8 M Sulfato de amónio

JCSG (14) – 20% PEG 3350; 0.2 M Tiocianato de sódio

JCSG (15) – 20% PEG 6000; 0.1 M Bicina pH=9

JCSG (16) – 10% PEG 6000; 10% PEG 8000; 8% Etilenoglicol; 0.1 M HEPES pH=7.5

JCSG (17) – 40% MPD; 5% PEG 8000; 0.1 M Cacodilato de sódio pH=6.5

JCSG (18) – 40% Etanol; 5% PEG 1000; 0.1 M Fosfato/citrato pH=4.2

JCSG (19) – 8% PEG 4000; 0.1 M Acetato de sódio pH=4.6

JCSG (20) – 10% PEG 8000; 0.1 M Tris-HCl pH=7; 0.2 mM Cloreto de magnésio

JCSG (21) – 20% PEG 6000; 0.1 M citrato pH=5; 100 mM Acetato de sódio

JCSG (22) – 50% PEG 200; 0.1 M Cacodilato de sódio pH=6.5; 0.2 M Cloreto de magnésio

JCSG (23) – 1.6 M Citrato tri-sódio

JCSG (24) – 20% PEG 3350; 0.2M Citrato tri-potássio

JCSG (25) – 20% PEG 8000; 0.1 M Fosfato/citrato pH=4.2; 0.2 M Cloreto de sódio

JCSG (26) – 20% PEG 6000; 0.1 M Citrato de sódio pH=4; 1 M Cloreto de lítio

JCSG (27) – 20% PEG 3350; 0.2 M Nitrato de amónio

JCSG (28) – 10% PEG 6000; 0.1 M NaHEPES pH=7; 0.8 M Fosfato dihidrogénio de sódio

JCSG (29) – 0.8 M Fosfato dihidrogénio de sódio; 0.8 M Fosfato dihidrogénio de potássio; 0.1 M NaHEPES pH=7.5

JCSG (30) – 40% PEG 300; 0.1 M Fosfato/citrato pH=4.2

JCSG (31) – 10% PEG 3000; 0.1 M Acetato de sódio pH=4.5; 0.2 M Acetato de zinco

JCSG (32) – 20% Etanol; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5

JCSG (33) – 25% 1,2-Propanodiol; 10% Glicerol; 0.1 M Fosfato sódio/potássio pH=6.2

JCSG (34) – 10% PEG 20000; 2% Dioxano; 0.1 M Bicina pH=9

JCSG (35) – 2 M Sulfato de amónio; 0.1 M Acetato de sódio pH= 4.6

JCSG (36) – 10% PEG 1000; 10% PEG 8000

JCSG (37) – 24% PEG 1500; 20% Glicerol

JCSG (38) – 30% PEG 400; 0.1M Na HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de magnésio

JCSG (39) – 50% PEG 200; 0.1 M Fosfato de sódio/potássio pH=6.2; 0.2 M Cloreto de sódio

JCSG (40) – 30% PEG 8000; 0.1 M Acetato de sódio pH=4.5; 0.2 M Sulfato de lítio

JCSG (41) – 70% MPD; 0.1 M HEPES pH=7.5

JCSG (42) – 20% PEG 8000; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Cloreto de magnésio

JCSG (43) – 40% PEG 400; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Sulfato de lítio

JCSG (44) – 40% MPD; 0.1 M Tris-HCl pH=8

JCSG (45) – 25.5% PEG 4000; 15% Glicerol; 0.17 M Sulfato de amónio

JCSG (46) – 40% PEG 300; 0.1 M Cacodilato de sódio pH=6.5; 0.2 M Acetato de cálcio

JCSG (47) – 14% 2-propanol; 30% Glicerol; 0.07 M Acetato de sódio pH=4.6; 0.14 M Cloreto de cálcio

JCSG (48) – 16% PEG 8000; 20% Glicerol; 0.04 M Fosfato dihidrogénio de potássio

7.6 – Screen de cristalização PEG/Ion 4K

PEG/Ion 4K (1) – 20% PEG 4K; 0.2 M Fluoreto de sódio; pH 7.1

PEG/Ion 4K (2) – 20% PEG 4K; 0.2 M Fluoreto de potássio; pH 7.2

PEG/Ion 4K (3) – 20% PEG 4K; 0.2 M Fluoreto de amónio; pH 6.2

PEG/Ion 4K (4) – 20% PEG 4K; 0.2 M Cloreto de lítio anidro; pH 6.7

PEG/Ion 4K (5) – 20% PEG 4K; 0.2 M Cloreto de magnésio hexahidratado; pH 5.8

PEG/Ion 4K (6) – 20% PEG 4K; 0.2 M Cloreto de sódio; pH 6.9

PEG/Ion 4K (7) – 20% PEG 4K; 0.2 M Cloreto de cálcio dihidratado; pH 5.1

PEG/Ion 4K (8) – 20% PEG 4K; 0.2 M Cloreto de potássio; pH 6.9

PEG/Ion 4K (9) – 20% PEG 4K; 0.2 M Cloreto de amónio; pH 6.3

PEG/Ion 4K (10) – 20% PEG 4K; 0.2 M Iodeto de sódio; pH 6.9

PEG/Ion 4K (11) – 20% PEG 4K; 0.2 M Iodeto de potássio; pH 6.8

PEG/Ion 4K (12) – 20% PEG 4K; 0.2 M Iodeto de amónio; pH 6.2

PEG/Ion 4K (13) – 20% PEG 4K; 0.2 M Tiocianato de sódio; pH 6.9

PEG/Ion 4K (14) – 20% PEG 4K; 0.2 M Tiocianato de potássio; pH 7

PEG/Ion 4K (15) – 20% PEG 4K; 0.2 M Nitrato de lítio; pH 7.1

PEG/Ion 4K (16) – 20% PEG 4K; 0.2 M Nitrato de magnésio hexahidratado; pH 5.8

PEG/Ion 4K (17) – 20% PEG 4K; 0.2 M Nitrato de sódio; pH 6.8

PEG/Ion 4K (18) – 20% PEG 4K; 0.2 M Nitrato de potássio; pH 6.9

PEG/Ion 4K (19) – 20% PEG 4K; 0.2 M Nitrato de amónio; pH 6.3

PEG/Ion 4K (20) – 20% PEG 4K; 0.2M Formato de magnésio; pH 5.9

PEG/Ion 4K (21) – 20% PEG 4K; 0.2 M Formato de sódio; pH 7.2

PEG/Ion 4K (22) – 20% PEG 4K; 0.2 M Formato de potássio; pH 7.3

PEG/Ion 4K (23) – 20% PEG 4K; 0.2 M Formato de amónio; pH 6.6

PEG/Ion 4K (24) – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de lítio dihidratado; pH 7.8

- PEG/Ion 4K (25)** – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de magnésio tetrahidratado; pH 7.7
- PEG/Ion 4K (26)** – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de zinco dihidratado; pH 6.3
- PEG/Ion 4K (27)** – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de sódio trihidratado; pH 7.9
- PEG/Ion 4K (28)** – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de cálcio hidratado; pH 7.3
- PEG/Ion 4K (29)** – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de potássio; pH 7.8
- PEG/Ion 4K (30)** – 20% PEG 4K; 0.2M Acetato de amónio; pH 7.1
- PEG/Ion 4K (31)** – 20% PEG 4K; 0.2M Sulfato de lítio monohidratado; pH 6.4
- PEG/Ion 4K (32)** – 20% PEG 4K; 0.2M Sulfato de magnésio heptahidratado; pH 5.9
- PEG/Ion 4K (33)** – 20% PEG 4K; 0.2M Sulfato de sódio decahidratado; pH 6.6
- PEG/Ion 4K (34)** – 20% PEG 4K; 0.2M Sulfato de potássio; pH 6.7
- PEG/Ion 4K (35)** – 20% PEG 4K; 0.2M Sulfato de amónio; pH 6
- PEG/Ion 4K (36)** – 20% PEG 4K; 0.2M Tartarato di-sodium dihidratado; pH 7.2
- PEG/Ion 4K (37)** – 20% PEG 4K; 0.2M Tartarato de potássio/sódio tetrahidratado; pH 7.2
- PEG/Ion 4K (38)** – 20% PEG 4K; 0.2M Tartarato di-amónio; pH 6.6
- PEG/Ion 4K (39)** – 20% PEG 4K; 0.2M Fosfato dihidrogénio de sódio monohidratado; pH 4.5
- PEG/Ion 4K (40)** – 20% PEG 4K; 0.2M Fosfato hidrogénio de disódio dihidratado; pH 9.1
- PEG/Ion 4K (41)** – 20% PEG 4K; 0.2M Fosfato de potássio dihidrogénio; pH 4.7
- PEG/Ion 4K (42)** – 20% PEG 4K; 0.2M Fosfato hidrogénio di-potássio; pH 9.2
- PEG/Ion 4K (43)** – 20% PEG 4K; 0.2M Fosfato dihidrogénio de amónio; pH 4.6
- PEG/Ion 4K (44)** – 20% PEG 4K; 0.2M Fosfato hidrogénio di-amónio; pH 7.9
- PEG/Ion 4K (45)** – 20% PEG 4K; 0.2M Citrato tri-lítio tetrahidratado; pH 8.1
- PEG/Ion 4K (46)** – 20% PEG 4K; 0.2M Citrato tri-sódio dihidratado; pH 8.2
- PEG/Ion 4K (47)** – 20% PEG 4K; 0.2M Citrato tri-potássio monohidratado; pH 8.3
- PEG/Ion 4K (48)** – 20% PEG 4K; 0.2M Citrato hidrogénio di-amónio; pH 5

7.7 – Screen de cristalização PEG/Ion 8K

PEG/Ion 8K (1) – 20% PEG 8K; 0.2 M Fluoreto de sódio; pH 7.1

PEG/Ion 8K (2) – 20% PEG 8K; 0.2 M Fluoreto de potássio; pH 7.2

PEG/Ion 8K (3) – 20% PEG 8K; 0.2 M Fluoreto de amónio; pH 6.2

PEG/Ion 8K (4) – 20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de lítio anidro; pH 6.7

PEG/Ion 8K (5) – 20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de magnésio hexahidratado; pH 5.8

PEG/Ion 8K (6) – 20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de sódio; pH 6.9

PEG/Ion 8K (7) – 20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de cálcio dihidratado; pH 5.1

PEG/Ion 8K (8) – 20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de potássio; pH 6.9

PEG/Ion 8K (9) – 20% PEG 8K; 0.2 M Cloreto de amónio; pH 6.3

PEG/Ion 8K (10) – 20% PEG 8K; 0.2 M Iodeto de sódio; pH 6.9

PEG/Ion 8K (11) – 20% PEG 8K; 0.2 M Iodeto de potássio; pH 6.8

PEG/Ion 8K (12) – 20% PEG 8K; 0.2 M Iodeto de amónio; pH 6.2

PEG/Ion 8K (13) – 20% PEG 8K; 0.2 M Tiocianato de sódio; pH 6.9

PEG/Ion 8K (14) – 20% PEG 8K; 0.2 M Tiocianato de potássio; pH 7

PEG/Ion 8K (15) – 20% PEG 8K; 0.2 M Nitrato de lítio; pH 7.1

PEG/Ion 8K (16) – 20% PEG 8K; 0.2 M Nitrato de magnésio hexahidratado; pH 5.8

PEG/Ion 8K (17) – 20% PEG 8K; 0.2 M Nitrato de sódio; pH 6.8

PEG/Ion 8K (18) – 20% PEG 8K; 0.2 M Nitrato de potássio; pH 6.9

PEG/Ion 8K (19) – 20% PEG 8K; 0.2 M Nitrato de amónio; pH 6.3

PEG/Ion 8K (20) – 20% PEG 8K; 0.2M Formato de magnésio; pH 5.9

PEG/Ion 8K (21) – 20% PEG 8K; 0.2 M Formato de sódio; pH 7.2

PEG/Ion 8K (22) – 20% PEG 8K; 0.2 M Formato de potássio; pH 7.3

PEG/Ion 8K (23) – 20% PEG 8K; 0.2 M Formato de amónio; pH 6.6

PEG/Ion 8K (24) – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de lítio dihidratado; pH 7.8

- PEG/Ion 8K (25)** – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de magnésio tetrahidratado; pH 7.7
- PEG/Ion 8K (26)** – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de zinco dihidratado; pH 6.3
- PEG/Ion 8K (27)** – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de sódio trihidratado; pH 7.9
- PEG/Ion 8K (28)** – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de cálcio hidratado; pH 7.3
- PEG/Ion 8K (29)** – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de potássio; pH 7.8
- PEG/Ion 8K (30)** – 20% PEG 8K; 0.2M Acetato de amónio; pH 7.1
- PEG/Ion 8K (31)** – 20% PEG 8K; 0.2M Sulfato de lítio monohidratado; pH 6.4
- PEG/Ion 8K (32)** – 20% PEG 8K; 0.2M Sulfato de magnésio heptahidratado; pH 5.9
- PEG/Ion 8K (33)** – 20% PEG 8K; 0.2M Sulfato de sódio decahidratado; pH 6.6
- PEG/Ion 8K (34)** – 20% PEG 8K; 0.2M Sulfato de potássio; pH 6.7
- PEG/Ion 8K (35)** – 20% PEG 8K; 0.2M Sulfato de amónio; pH 6
- PEG/Ion 8K (36)** – 20% PEG 8K; 0.2M Tartarato di-sodium dihidratado; pH 7.2
- PEG/Ion 8K (37)** – 20% PEG 8K; 0.2M Tartarato de potássio/sódio tetrahidratado; pH 7.2
- PEG/Ion 8K (38)** – 20% PEG 8K; 0.2M Tartarato di-amónio; pH 6.6
- PEG/Ion 8K (39)** – 20% PEG 8K; 0.2M Fosfato dihidrogénio de sódio monohidratado; pH 4.5
- PEG/Ion 8K (40)** – 20% PEG 8K; 0.2M Fosfato hidrogénio de disódio dihidratado; pH 9.1
- PEG/Ion 8K (41)** – 20% PEG 8K; 0.2M Fosfato de potássio dihidrogénio; pH 4.7
- PEG/Ion 8K (42)** – 20% PEG 8K; 0.2M Fosfato hidrogénio di-potássio; pH 9.2
- PEG/Ion 8K (43)** – 20% PEG 8K; 0.2M Fosfato dihidrogénio de amónio; pH 4.6
- PEG/Ion 8K (44)** – 20% PEG 8K; 0.2M Fosfato hidrogénio di-amónio; pH 7.9
- PEG/Ion 8K (45)** – 20% PEG 8K; 0.2M Citrato tri-lítio tetrahidratado; pH 8.1
- PEG/Ion 8K (46)** – 20% PEG 8K; 0.2M Citrato tri-sódio dihidratado; pH 8.2
- PEG/Ion 8K (47)** – 20% PEG 8K; 0.2M Citrato tri-potássio monohidratado; pH 8.3
- PEG/Ion 8K (48)** – 20% PEG 8K; 0.2M Citrato hidrogénio di-amónio; pH 5

7.8 – *Screen* de cristalização 80!

- 1 30% MPD; 0.1 M Acetato pH=4.5; 0.2 M Cloreto de cálcio
- 2 1 M Tartarato de potássio/sódio; 0.1 M MES pH=6.5
- 3 0.4 M Fosfato de amónio
- 4 3 M Sulfato de amónio; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5
- 5 30% MPD; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Citrato de sódio
- 6 30% PEG 4K; 0.1 M Acetato pH=4.5; 0.2 M Cloreto de magnésio
- 7 1.2 M Citrato de sódio; 0.1 M HEPES pH=7.5
- 8 0.2 M Citrato de sódio
- 9 30% PEG 400; 0.1 M Citrato pH=5.5; 0.2 M Acetato de amónio
- 10 0.1 M Acetato pH=4.5; 1.5 M Fosfato de amónio
- 11 1.5 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1.5 M Fosfato hidrogénio di-sódio; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Sulfato de amónio
- 12 20% PEG 400; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Citrato de sódio
- 13 25% PEG 4K; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de cálcio
- 14 30% PEG 8K; 0.1 M MES pH=6.5; 0.1 M Cloreto de magnésio
- 15 30% PEG 4K; 0.1 M Citrato pH=5.5; 0.2M Sulfato de lítio
- 16 0.1 M Acetato pH=4.5; 1 M Sulfato de lítio
- 17 30% MPD; 0.1 M Tris-HCl pH=7.5; 0.2 M Fosfato de amónio
- 18 1.5 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1.5 M Fosfato dihidrogénio de sódio; 0.1 M Tris-HCl pH=7.5; 0.2 M Acetato de amónio
- 19 30% PEG 8K; 0.1 M Citrato pH=5.5; 0.1 M Sulfato de amónio
- 20 30% MPD; 0.1 M MES pH=6.5
- 21 30% PEG 4K; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de magnésio
- 22 30% PEG 4K; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Acetato de sódio
- 23 1 M Tartarato de potássio/sódio; 0.1 M Tris-HCl pH=7.5
- 24 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Cloreto de cálcio
- 25 30% MPD; 0.1 M Citrato pH=5.5; 0.5 M Acetato de amónio
- 26 0.1 M MES pH=6.5; 2 M Acetato de sódio
- 27 30% PEG 8K; 0.1 M MES pH=6.5; 0.2 M Tartarato de potássio/sódio
- 28 0.1 M HEPES pH=7.5; 1 M Tartarato de potássio/sódio;
- 29 30% PEG 400; 0.1 M Acetato pH=4.5; 0.2 M Sulfato de amónio
- 30 20% PEG 4K; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.1 M Sulfato de amónio
- 31 0.1 M MES pH=6.5; 2 M Sulfato de amónio

- 32 30% Etanol; 0.1 M MES pH=6.5; 0.2 M Cloreto de sódio
- 33 30% Etanol; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de magnésio
- 34 30% Etanol; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Acetato de amónio
- 35 30% Etanol; 0.1 M Acetato pH=4.5; 0.2 M Cloreto de cálcio
- 36 30% Etanol; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Acetato de sódio
- 37 30% Isopropanol; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de magnésio
- 38 30% MPD; 0.1 M Cacodilato pH=6.5
- 39 2 M Formato de sódio; 0.1 M Acetato pH=4.5
- 40 40% Isopropanol; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Citrato de sódio
- 41 20% PEG 400; 10% Isopropanol; 0.1 M HEPES pH=7.5
- 42 1 M Sulfato de lítio; 0.1 M HEPES pH=7.5
- 43 30% PEG 4K; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Sulfato de lítio
- 44 30% PEG 6K; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Sulfato de amónio
- 45 1.5 M Acetato de sódio; 0.1 M Acetato pH=4.5
- 46 1 M Fosfato dihidrogénio de amónio; 0.1 M Citrato de sódio
- 47 4M Formato de sódio
- 48 1.2 M Citrato de sódio; 0.1 M HEPES pH=7.5
- 49 0.4 M Tartarato de potássio/sódio
- 50 30% PEG 4K; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Cloreto de magnésio
- 51 1.4 M Acetato de sódio; 0.1 M Cacodilato pH=6.5
- 52 30% PEG 4K; 0.1 M Citrato pH=5.5; 0.2 M Acetato de amónio
- 53 30% PEG 4K; 0.1 M Citrato pH=4.5; 0.2 M Acetato de amónio
- 54 28% PEG 400; 0.1 M HEPES pH=7.5; 0.2 M Cloreto de cálcio
- 55 30% PEG 8K; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Sulfato de amónio
- 56 30% PEG 8K; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Acetato de magnésio
- 57 30% Isopropanol; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5; 0.2 M Acetato hidrogénio de amónio
- 58 25% PEG 4K; 0.1 M Acetato pH=4.5; 0.2 M Sulfato de amónio
- 59 30% MPD; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Acetato de magnésio
- 60 20% Isopropanol; 0.1 M Acetato pH=4.5; 0.2 M Cloreto de cálcio
- 61 1 M Acetato de sódio; 0.1 M Imidazol pH=7
- 62 20% Isopropanol; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Citrato de sódio
- 63 30% PEG 8K; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Acetato de sódio
- 64 30% PEG 8K; 0.2 M Sulfato de amónio
- 65 30% PEG 4K; 0.2 M Sulfato de amónio
- 66 1.6 M Fosfato hidrogénio di-potássio; 1.6 M Fosfato dihidrogénio de sódio; 0.1 M HEPES pH=7.5

- 67 8% PEG 8K; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5
- 68 8% PEG 4K; 0.1 M Acetato pH=4.5
- 69 1.8 M Fosfato dihidrogénio de amónio; 2% PEG 400; 0.1 M HEPES pH=7.5
- 70 20% PEG 4K; 20 % Isopropanol; 0.1 M Citrato pH=5.5
- 71 20% PEG 8K; 0.05 M Fosfato hidrogénio di-potássio
- 72 30% PEG 1K
- 73 0.2 M Formato de magnésio
- 74 18% PEG 8K; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Acetato de zinco
- 75 18% PEG 8K; 0.1 M Cacodilato pH=6.5; 0.2 M Acetato de cálcio
- 76 2 M Sulfato de amónio; 0.1 M Acetato pH=4.5
- 77 2 M Sulfato de amónio; 0.1 M Tris-HCl pH=8.5
- 78 2% PEG 8K; 1 M Sulfato de lítio
- 79 18% PEG 8K; 0.5 M Sulfato de lítio
- 80 20 % PEG 4K; 20 % Isopropanol; 0.1 M Citrato pH=5.5; 0.2 M Acetato de amónio

7.9 – Composição do meio MM

Para um litro de meio MM (do inglês *Minimal Methanol*), dissolver 15 g de agar em 800 ml de água destilada e autoclavar durante 20 minutos.

Após a solução arrefecer até 60 °C, adicionar: 100 ml de 10X YNB (base de nitrogénio de levedura com sulfato de amónia sem aminoácidos), 2 ml de 500X biotina esterilizada por filtração e 100 ml de 10X metanol esterilizado por filtração.

Distribuir por placas e guardá-las a 4 °C.

7.10 – Composição do meio BMGY

Para um litro de meio BMGY (do inglês *Buffered Glycerol-complex Medium*), dissolver 10 g de extracto de levedura e 20 g de peptona em 700 ml de água destilada e autoclavar durante 20 minutos.

Esperar até a solução arrefecer até à temperatura ambiente e adicionar: 100 ml de tampão fosfato de potássio 1M (pH=6) autoclavado, 100 ml de 10X YNB, 2 ml de 500X biotina esterilizada por filtração e 100 ml de 10X glicerol autoclavado. Conservar a 4 °C.

7.11 – Composição do meio Basal Salt

Para um litro de meio Basal Salt dissolver 26,7 ml de ácido fosfórico 85%, 0,93 g de sulfato de cálcio dihidratado, 18,2 g de sulfato de potássio, 14,9g de sulfato de magnésio heptahidratado e 4,13 g de hidróxido de potássio em cerca de 500 ml de água destilada. Ajustar o pH da solução para 5 com hidróxido de amónio e perfazer o volume até um litro com água destilada. Autoclavar a solução durante 20 minutos

7.12 – Composição do meio PTM-1

Para um litro de meio PTM-1 dissolver 6,0 g de sulfato de cobre pentahidratado, 0,08 g de iodeto de sódio, 3,0 g de sulfato de manganês monohidratado, 0,2 g de molibdato de sódio dihidratado, 0,02 g de ácido bórico, 0,5 g cloreto de cobalto, 20,0 g de cloreto de zinco, 65,0 g de sulfato ferroso heptahidratado, 5,0 ml de ácido sulfúrico e 0,2 g de biotina em cerca de 500 ml de água destilada. Perfazer o volume até um litro com água destilada e esterilizar por filtração.